ÜBER DEN ZUSAMMENHANG ZWISCHEN STRAHLENBEDINGTEN ELEKTROLYTVERSCHIEBUNGEN UND STRUKTURELLEN MEMBRANVERÄNDERUNGEN BEI MENSCHLICHEN ERYTHROZYTEN

EINE VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG DER WIRKUNG VON RÖNTGENSTRAHLEN UND DER WIRKUNGEN VON PARACHLOROMERCURIBENZOAT, N-ÄTHYLMALEINIMID UND N-BROMSUCCINIMID

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
Hildegard Theobald
aus Lutzerath

Bonn 1976

ÜBER DEN ZUSAMMENHANG ZWISCHEN STRAHLENBEDINGTEN ELEKTROLYTVERSCHIEBUNGEN UND STRUKTURELLEN MEMBRANVERÄNDERUNGEN BEI MENSCHLICHEN ERYTHROZYTEN

EINE VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG DER WIRKUNG VON RÖNTGENSTRAHLEN UND DER WIRKUNGEN VON PARACHLOROMERCURIBENZOAT, N-ÄTHYLMALEINIMID UND N-BROMSUCCINIMID

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
Hildegard Theobald
aus Lutzerath

Bonn 1976

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Privatdozent Dr. H. Rink

2. Gutachter: Privatdozent Dr. H.-R. Koch

Aus dem Institut für Biophysik der Universität Bonn
Komiss. Leiter: Professor Dr. H.-D. Bergeder

Druck: V + V Sofortdruck, Bonn

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Ich danke

Herrn Priv. Doz. Dr. H. Rink für die Überlassung des Themas und seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft

Herrn Prof. Dr. H.-D. Bergeder für die Überlassung eines Arbeitsplatzes und für sein förderndes Interesse

Herrn Prof. Dr. H. Egli, dem Direktor des Instituts für Experimentelle Hämatologie und Bluttransfusionswesen, der die Durchführung der Arbeit durch Überlassung von Erythrozytenkonzentraten ermöglicht hat

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523713_0046

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1	Einleitung	7
1.1	Permeabilitätsänderungen und Stoffwechsel nach Bestrahlung	7
1.2	SH-Gruppen der Zellmembran und deren Veränderung nach Bestrahlung	10
1.3	Hämolyse nach Stahleneinwirkung	12
1.4	Fragestellung	13
2	Material und Methode	14
2.1	Erythrozyten: Gewinnung und Handhabung	14
2.2	Agentien	15
2.3	Bestrahlung	16
2.4	Vorbereitung zur Analyse	16
2.5	Flammenfotometrie	16
2.6	Hämoglobin - Bestimmung	17
3	Ergebnisse	18
3.1	K^+-Na^+-Verschiebungen unbestrahlter und bestrahlter Erythrozyten	18
3.1.1	Elektrolytgehalt unbestrahlter Erythrozyten	18
3.1.2	Elektrolytverschiebungen bei bestrahlten Erythrozyten in Abhängigkeit von der Dosis	19
3.1.3	Elektrolytverschiebungen bei bestrahlten Erythrozyten in Abhängigkeit von der Suspensionszeit	20

Seite

3.2 Elektrolytverschiebungen bei bestrahlten und unbestrahlten Erythrozyten nach Zusatz von pCMB 24

3.2.1 Konzentrationabhängigkeit 24
3.2.2 Dosisabhängigkeit 25
3.2.3 Zeitabhängigkeit 27
3.2.4 Zusammenfassung 29

3.3 Elektrolytverschiebungen bei Erythrozyten nach Zusatz von NEM 32

3.3.1 Konzentrationsabhängigkeit 32
3.3.2 Dosisabhängigkeit 33
3.3.3 Zeitabhängigkeit 34
3.3.4 Zusammenfassung 37

3.4 Elektrolytverschiebungen bei Erythrozyten nach Zusatz von NBS 40

3.4.1 Konzentrationsabhängigkeit 40
3.4.2 Dosisabhängigkeit 41
3.4.3 Zeitabhängigkeit 42
3.4.4 Hämolyse durch NBS 46
3.4.5 Zusammenfassung 48

4 Diskussion 49

4.1 Ermittelte Werte 49
4.2 Die Imitation der Strahlenwirkung 49
4.3 Die Addition der Noxen 51

5 Zusammenfassung 54

6 Literaturverzeichnis 56

Lebenslauf

1 E I N L E I T U N G

1.1 Permeabilitätsänderungen und Stoffwechsel nach Bestrahlung

Für den geordneten Ablauf vieler Lebensvorgänge ist die Zusammensetzung des Elektrolytmilieus nach Art und Konzentration der einzelnen Ionen von besonderer Bedeutung. Dies gilt nicht nur für den Gesamtorganismus, sondern auch für einzelne Organe und isolierte Zellen (LEHNARTZ 1959). Zur Erhaltung eines konstanten Ionengehaltes sind dabei sowohl die Mechanismen des aktiven Transportes als auch eine intakte Membran unerläßliche Voraussetzungen. Nach Einwirkung ionisierender Strahlen auf isolierte Organe und Zellsuspensionen ändern sich die zellulären Ionen-Konzentrationen im Sinne eines Abbaus bestehender Konzentrationsgradienten. Man spricht von strahlenbedingten Elektrolytverschiebungen. Der K^+-Gehalt der Zellen sinkt ab, der Na^+-Gehalt steigt an. Diese Tatsache ist seit langem bekannt und auch an Erythrozyten untersucht worden (LEHMAN u. WELS 1926, TING u. ZIRKLE 194o, SHEPPARD u. STEWART 1952). Viele Untersuchungen befaßten sich mit der Beschreibung dieses Phänomens, aber nur wenige Autoren versuchten Ursachen und Folgen der strahlenbedingten Elektrolytverschiebungen zu erfassen (MYERS 197o, CHAPMAN u. STURROCK 1972, RINK 1974).

Die meisten Untersuchungen über den Mechanismus strahlenbedingter Permeabilitätsänderungen wurden mit Erythrozyten durchgeführt. Als definierte Einzelzellen sind sie jederzeit gut zugänglich und können in vitro untersucht werden. Da sie weder Kern noch Mitochondrien besitzen und nur über einen relativ niedrigen Energiestoffwechsel verfügen, sind sie gerade für Permeabilitätsuntersuchungen besonders geeignet.

Die Bestrahlung von Erythrozyten hat einen Verlust an intrazellulärem K^+ zur Folge, der durch einen Einstrom von Na^+ aus dem Suspensionsmedium kompensiert wird. Diese Ionenverschiebung ist äquivalent und beginnt sofort nach der Bestrahlung (MYERS u. BIDE 1966). Je nach Strahlendosis erfolgt gleichzeitig eine mehr oder weniger starke Hämolyse (KOLLMANN, SHAPIRO u. MARTIN 1969). Das Ausmaß der Elektrolytverschiebungen wird von der Strahlendosis und der Suspensionszeit, aber auch von der Temperatur beeinflußt, bei der die Zellen nach der Bestrahlung suspendiert werden. Bei niedriger Temperatur (4^oC) sind die Veränderungen am stärksten ausgeprägt (SHEPPARD u. STEWART 1952, MORCZEK u. ABRAHAM 1967). Dieser Befund weist deutlich auf passive Ionenverschiebungen hin, die nur sekundär vom Stoffwechsel beeinflußt werden. Bei 37^oC besteht im Dosisbereich von 0 bis 200 krad eine lineare Beziehung zwischen Strahlendosis und K^+-Verlust (MORCZEK 1955). Bei 4^oC findet sich diese lineare Abhängigkeit jedoch nur bis zu einer Dosis von etwa 20 krad (SHEPPARD u. STEWART 1952, CIVIDALLI 1963, SHAPIRO, KOLLMANN u. ASNEN 1966, MYERS u. BIDE 1966).

Der Anstieg der K^+- und Na^+-Permeabilität beruht auf einer selektiven Veränderung der Membranpermeabilität für einwertige Kationen. Sie besteht auch für die monovalenten Kationen Rb^+ und Cs^+, die sich wie K^+- bzw. Na^+-Ionen verhalten, jedoch nicht für bivalente Kationen wie Ca^{++} und Sr^{++}. Für Anionen wie Phosphat und Chromat oder für organische Moleküle bleibt die Permeabilität unverändert (MYERS u. BIDE 1966, SUTHERLAND, STANNARD u. WEED 1967, SHAPIRO u. KOLLMANN 1968).

Viele Untersuchungen beschäftigen sich mit der Frage, ob die Permeabilitätsveränderung auf eine veränderte Menbranstruktur zurückgeführt werden kann, oder ob Störungen des Zellstoffwechsels bzw. des aktiven Ionentransportes hierfür verantwortlich sind. Die bisher vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, daß es sich im wesentlichen um passive Ionenverschiebungen handelt. So läßt sich zum Beispiel zeigen, daß die K^+-Na^+-aktivierbare Membran-

ATP-ase (K^+-Na^+-Pumpe) selbst bei Erythrozyten, die mit 50 krad bestrahlt wurden, noch sehr effektiv arbeitet. Denn durch Zusatz des ATP-ase hemmenden Glykosids Ouabain ist es möglich, den K^+-Verlust bestrahlter Erythrozyten noch zu verstärken. Dieser Effekt tritt allerdings nur dann ein, wenn diese Erythrozyten bei 37°C inkubiert werden. Er bleibt aus bei niedrigen Temperaturen, bei denen die K^+-Na^+-aktivierbare Membran-ATP-ase wegen des niedrigen Energiestoffwechsels nur eine geringe Aktivität aufweist (MYERS u. LEVY 1964).

Der Stoffwechsel der Erythrozyten wird durch die Bestrahlung mit Dosen bis 10 krad nicht gehemmt; es läßt sich bei 37°C sogar eine vorübergehende Aktivitätssteigerung der Glykolyse um 20-35 % feststellen. Der ATP-Gehalt der Zellen steigt dabei an (BRESCIANI, AURICCHIO u. FIORE 1964, KANKURA, NAKAMURA, ETO u. NAKAO 1968). Diese Vorgänge lassen sich durchaus so deuten, daß eine Zelle versucht, unter Aufwendung von Energie dem K^+-Verlust entgegen zu arbeiten. Bei niedrigen Temperaturen bleiben diese Leistungen weitgehend aus, so daß schon Dosen von 100 rad zu Elektrolytverschiebungen führen (KANKURA, NAKAMURA, ETO u. NAKAO 1968). Durch die Bestrahlung mit Dosen zwischen 10 und 40 krad wird der Glukose-Verbrauch nicht signifikant verändert (CIVIDALLI 1963). Außerdem hat weder der Zusatz von Glukose noch der Zusatz des Glykolyseinhibitors NaF einen Einfluß auf die strahlenbedingten Elektrolytveränderungen (KANKURA, NAKAMURA, ETO u. NAKAO 1968).

Einen wichtigen Angriffspunkt für ionisierende Strahlen kann das zelluläre Glutathion darstellen, da SH-Gruppen besonders strahlenempfindlich sind. Sofort nach der Bestrahlung kann man in Abhängigkeit von der Dosis einen deutlichen Abfall des Glutathionspiegels der Zellen beobachten. Werden die Zellen nach Bestrahlung mit 100 krad bei 37°C inkubiert, steigt der Glutathionspiegel innerhalb von 2 Stunden wieder an und erreicht höhere Werte als vor der Bestrahlung. Danach fällt er auf den Ausgangswert zurück. Bei 4°C erholen sich die Zellen nur langsam,

erreichen aber nach 3 Stunden den ursprünglichen Glutathionspiegel wieder (MYERS u. BIDE 1966). Neuere Experimente an Ratten bestätigen diese Ergebnisse (RATHGEN u. LIESER 1972).

1.2 SH-Gruppen der Zellmembran und deren Veränderung nach Bestrahlung

Direkte Messungen des Thiolgehaltes der Erythrozytenmembran zeigten, daß der Gehalt an SH-Gruppen der Zelloberfläche durch die Bestrahlung vermindert wird, während gleichzeitig eine Zunahme an Disulfiden festzustellen ist. Diese Abnahme von SH-Gruppen ist bei Membranschatten stärker als bei intakten Erythrozyten (SUTHERLAND, STANNARD u. WEED 1967, SHAPIRO u. KOLLMANN 1968, SUTHERLAND u. PIHL 1968). Bis 60 % der veränderten SH-Gruppen können wiederhergestellt werden, wenn die Erythrozyten nach der Bestrahlung in Gegenwart von Glukose inkubiert werden. Bei niedrigen Temperaturen und Fehlen von Glukose, aber auch bei Membranschatten, bleibt diese Restitution aus (SUTHERLAND, STANNARD u. WEED 1967, SUTHERLAND u. PIHL 1968).

Versuche mit Radikalfängern wie z.B. Paraaminobenzoesäure (PABA) sprechen dafür, daß die strahlenbedingten Veränderungen an SH-Gruppen zum großen Teil durch OH-Radikale hervorgerufen werden. So wird durch Zusatz von PABA im Suspensionsmedium vor Bestrahlung der K^+-Efflux um 50 % vermindert (NAKKEN 1966). Weitere Untersuchungen zeigten, daß der Strahleneffekt abgeschwächt wird, wenn Thiole wie Mercaptoäthylguanidin (MEG) und Mercaptoäthylamin (MEA) nach der Bestrahlung dem Suspensionsmedium zugegeben werden (SHAPIRO, KOLLMANN u. ASNEN 1966, MYERS u. SLADE 1967). Diese Wirkung kann über den SH⇄SS-Austauschmechanismus erklärt werden (ELDJARN u. PIHL 1961).

Für eine wesentliche Beteiligung der SH-Gruppen bei der strahlenbedingten Permeabilitätsstörung spricht die Tatsache, daß durch

SH-blockierende Substanzen wie p-Chloromercuribenzosulfonsäure (pCMBS) gleiche oder doch zumindest sehr ähnliche Permeabilitätsveränderungen ausgelöst werden können (BIDE u. MYERS 1967, SUTHERLAND, STANNARD u.WEED 1967, KOLLMANN, SHAPIRO u. MARTIN 1969). Eine Bestrahlung von Erythrozyten, die mit pCMBS vorbehandelt waren, ergab eine additive Wirkung beider Noxen, allerdings nur bis zu einem bestimmten Maximum. Bei größeren Konzentrationen an SH-Blockern bleibt ein zusätzlicher Strahleneffekt aus; möglicherweise deshalb, weil keine SH-Gruppen mehr als Angriffspunkte für die bei der Radiolyse des Wassers entstehenden Radikale zur Verfügung stehen (SHAPIRO u. KOLLMANN 1968). Von einigen Autoren wird daher die Permeabilitätssteigerung durch ionisierende Strahlen im wesentlichen auf die Oxidation von Membran-SH-Gruppen und die daraus resultierende Desorganisation der Lipoproteinstruktur der Membran zurückgeführt (SHAPIRO, KOLLMANN u. ASNEN 1966, SUTHERLAND, STANNARD u. WEED 1967, SUTHERLAND u. PIHL 1968, SHAPIRO u. KOLLMANN 1968, GODIN u. SCHRIER 1971). Da pCMBS nur sehr langsam in die Zelle eindringt, müssen sich diese Veränderungen in den äußeren Schichten oder in den Poren der Membran abspielen (SHAPIRO u. KOLLMANN 1968).

Andere Autoren postulieren die Beteiligung weiterer Faktoren, nämlich die Zerstörung von Disulfidbrücken mit nachfolgender Desorganisation der Lipoproteinstruktur (MYERS u. SLADE 1967, MYERS 1970). Für einen solchen Mechanismus spricht die Tatsache, daß intakte Erythrozyten durch Bestrahlung gegenüber einer nachfolgenden Behandlung mit lytischen Enzymen sensibilisiert sind (MYERS u. SLADE 1967). Auch Ergebnisse, die bei der Bestrahlung von Proteinen gewonnen wurden, zeigen, daß die Zerstörung von Disulfidbrücken durch Bestrahlung möglich ist. Die Bestrahlung von isolierten Erythrozytenmembranen führt zu einer Inaktivierung von Enzymaktivitäten, die durch SH-blockierende Agentien nicht erreicht werden kann. Das heißt, neben der Oxidation von SH-Gruppen können auch noch andere Veränderungen an der Permeabilitätserhöhung beteiligt sein. Die Behandlung mit Dithiothreitol, einer Sustanz, die Disulfide durch Reduktion in freie SH-

Gruppen überführt, hat den gleichen Effekt auf diese Enzymaktivitäten wie die Bestrahlung (MYERS u. CHURCH 1967). Myers zieht daraus den Schluß, daß neben der Oxidation von SH-Gruppen auch eine Spaltung von Disulfid-Gruppen zum Strahleneffekt beiträgt.

1.3 Hämolyse nach Strahleneinwirkung

Die strahlenbedingte Hämolyse korreliert mit dem K^+-Verlust nur, wenn die bestrahlten Erythrozyten bei pH 7,4 und 37°C inkubiert werden. Im Gegensatz zu dem K^+-Verlust, der stark temperaturabhängig ist, sind die Strahlendosen, die notwendig sind, um bei 4°C bzw. 37°C eine Hämolyse hervorzurufen, annähernd gleich (MYERS u. SLADE 1967).
Eine wesentliche Ursache für die Hämolyse ist die Zunahme der Na^+-Konzentration in den Erythrozyten und der dadurch bedingte höhere Wassergehalt, der eine Schwellung zur Folge hat. Wird Na^+ in der Suspensionslösung durch Cholin oder andere organische Komponenten ersetzt, so wird die Schwellung der Zellen und damit auch die Hämolyse abgeschwächt bzw. verhindert (SUTHERLAND, STANNARD u. WEED 1967, KOLLMANN, SHAPIRO u. MARTIN 1969).
Da jedoch bei niedrigen Temperaturen die Hämolyse nicht mit dem K^+-Verlust und der entsprechenden Na^+-Aufnahme ansteigt, müssen für die Hämolyse noch weitere Faktoren maßgebend sein (MYERS 1970).
Myers vertritt die Ansicht, daß ein weiterer wichtiger Faktor die Schwächung der Membran durch spontane Bildungen von Lipidperoxiden während der Inkubation nach Bestrahlung ist. Die Lipidperoxydation korreliert mit der Zerstörung von Lipid-Antioxidantien (Tokopherol) in der Erythrozytenmembran. Sie ist nicht temperaturabhängig (MYERS u. BIDE 1966, MYERS 1970).

1.4 Fragestellung

Strahlenbedingte Elektrolytverschiebungen sind für viele Zellen und Organe in vivo und in vitro beschrieben worden. Die ursächlichen Veränderungen, die zu diesem Phänomen führen, sind allerdings nur teilweise bekannt. In der vorliegenden Arbeit wird versucht, durch Einsatz verschiedener Agentien, die mit Komponenten der Zellmembran in Wechselwirkung treten, gleiche oder ähnliche Elektrolytverschiebungen hervorzurufen, wie sie nach Strahleneinwirkung beobachtet werden. Ein Vergleich der isolierten Wirkungen beider Noxen (Strahlung und Agenz) sowie die Untersuchung des additiven bzw. nicht-additiven Verhaltens beim kombinierten Einsatz beider Noxen soll Rückschlüsse auf den Mechanismus der Schädigung bzw. auf den Angriffsort der ionisierenden Strahlen erlauben. Letzteres sollte immer dann möglich sein, wenn die chemische Reaktivität der eingesetzten Agentien,die gleiche oder ähnliche Wirkungen wie Röntgenstrahlen hervorrufen, bekannt ist.

Aus einer Gruppe von 15 membranwirksamen Substanzen wurden 3 ausgewählt:

Parachloromercuribenzoat (pCMB)[1]
N-Äthylmaleinimid (NEM)[2]
N-Bromsuccinimid (NBS)[3]

Ihre Wirkung auf den Elektrolytgehalt der Erythrozyten in Abhängigkeit von der Konzentration, der Suspensionszeit und der Strahlendosis werden untersucht.

1,2,3 Wirkungsweise siehe 2.2

2 MATERIAL UND METHODE

2.1 Erythrozyten: Gewinnung und Handhabung

Menschliche Erythrozyten wurden 1-3 Stunden nach der Entnahme von jeweils einem Spender vom Institut für Hämatologie und Bluttransfusionswesen der Universität Bonn für die Versuche übernommen. Zu diesem Zeitpunkt war das Plasma bereits abzentrifugiert. Die Erythrozyten wurden dreimal in isotoner NaCl-Lösung (0,89 %ige Lsg. = 0,152 M), die mit 0,1 N Na_2HPO_4 auf pH 7,4 eingestellt war, gewaschen. Hierzu wurde jedesmal NaCl im Verhältnis 1:1 zugegeben, anschließend 3 min bei 2000 U/min (4870 g) zentrifugiert und der Überstand einschließlich des "buffy-coats" abgehoben. Danach wurden die Erythrozyten in isotoner NaCl-Lösung suspendiert.

Die zur Bestrahlung vorgesehenen Erythrozyten wurden in Petrischalen gegeben, und zwar jeweils 10 ml Erythrozyten + 20 ml NaCl-Lösung. Die Schalen wurden mit Parafilm verschlossen und nacheinander bestrahlt. Bis zur Bestrahlung standen die Proben bei 4°C in der Kühlkammer. Gleich nach der Bestrahlung wurde der Inhalt einer Petri-Schale zu gleichen Teilen in zwei 100 ml Erlenmeyerkolben aufgeteilt und jeweils 15 ml isotone NaCl-Lösung zur Suspension zugegeben. Wurden die Erythrozyten zusätzlich mit Substanzen behandelt, so war die entsprechende Substanz in diesen zugesetzten 15 ml gelöst. Die entgültige Suspension enthielt also 5 ml Erythrozyten und 25 ml NaCl-Lösung mit oder ohne Agentien.
Im gleichen Verhältnis 1:6 (5 ml Erythrozyten u. 25 ml NaCl-Lösung) wurden Kontrollproben aus unbestrahlten Erythrozyten hergestellt und in der Kühlkammer unter gleichen Bedingungen aufbewahrt. Während der Suspensionszeit wurden die Proben mit Magnetkernen auf einer Kühlplatte leicht gerührt.

2.2. Agentien

Die von der Fa. Merck bezogenen Agentien Parachloromercuribenzoat (pCMB), N-Äthylmaleinimid (NEM) und N-Bromsuccinimid (NBS) wurden jeweils in isotoner NaCl-Lsg. gelöst und mit o,1 N Na_2HPO_4 ein pH-Wert von 7,4 eingestellt.
Untersuchungen wurden in folgenden Konzentrationsbereichen vorgenommen:

pCMB 10^{-5} - 10^{-3} M
NEM 10^{-5} - 10^{-2} M
NBS 10^{-5} - 10^{-3} M

Der Zusatz der Substanzen erfolgte jeweils im Anschluß an die Bestrahlung.

pCMB und NEM werden zur Markierung und Bestimmung von SH-Gruppen in Proteinen benützt (BREWER u. RIEHM 1967, DEME, DUNICA-TRAUTMANN u. CHATAGNER 1971). Die beiden SH-Reagentien unterscheiden sich vor allem hinsichtlich ihrer Membranpermeabilität und ihrer Reaktivität. pCMB reagiert mit SH-Gruppen unter Bildung von Mercuri-Mercaptiden (CECIL u. MCPHEE 1959). NEM ist eine alkylierende Substanz, die stabile Verbindungen mit SH-Gruppen eingeht (SMYTH, NAGAMATSU u. FRUTON 1960). Darüberhinaus konnte man für NEM auch Reaktionen mit NH_2-Gruppen und Imidazolgruppen von Aminosäuren nachweisen. Diese Reaktionen laufen allerdings sehr viel langsamer ab (BREWER u. RIEHM 1967). Weiterhin sind durch NEM verursachte Konformationsänderungen an Proteinen bekannt geworden (BIRCHMEYER u. CHRISTEN 1971). Im Gegensatz zu pCMB, das nur schwer die Zellmembran passieren kann, dringt NEM frei in die Zelle ein und blockiert auch intracelluläre SH-Gruppen (JAKOB u. JANDL 1962)

NBS ist eine Substanz, die zur Bestimmung von Tryptophan in Proteinen verwendet wird (SPANDE, GREEN u. WITKOP 1966, FREISHEIM u. HUENNEKENS 1969). Bei einem Überschuß dieser Substanz und niedrigem pH-Wert kommt es in der Nachbarschaft von Tryptophan, Tyrosin und Histidin zur chemischen Spaltung von Proteinen (WITKOP 1968)

2.3 Bestrahlung

Die Bestrahlung erfolgte mit einer Röntgenröhre "RT 200" der Fa. C.H.F. Müller mit 0,5 mm Cu-Filter bei 200 kV und 20 mA. Die im Fokusabstand (18 cm) gemessene Dosisleistung betrug 525 R/min. Die Erythrozyten-Suspensionen wurden mit Dosen von 2,5 - 20 krad bestrahlt. Während der Bestrahlung wurden die Proben gekühlt und mäßig gerührt. Anschließend wurden sie unter Rühren verschieden lange bei $4^{o}C$ suspendiert.

2.4 Vorbereitung zur Analyse

Nach Ablauf der Suspensionszeit wurden die Proben zentrifugiert (3 min bei 2000 U/min = 4870 g) und die Suspensionslösung abgehoben. Anschließend wurden die Erythrozyten dreimal in Tris-Puffer gewaschen (Tris 0,16 N mit 0,16 N HCL auf pH 7,4 gepuffert). Die beiden ersten Male wurde 3 min bei 2000 U/min zentrifugiert, beim dritten Male, vor Entnahme der Erythrozyten zur Analyse, 10 min bei 3000 U/min (10950 g). Aus dem Sediment (Hämatokrit 95 - 98 %) wurden nach Abpipettieren des Überstandes jeweils 2x 0,5 ml Erythrozyten entnommen und mit aqua bidest. hämolysiert.

2.5 Flammenfotometrie

Die Elektrolytbestimmungen im Hämolysat wurden mit einem Flammenfotometer "PF 5" der Fa. Carl Zeiss durchgeführt. Hierzu wurde das Hämolysat 1:200 mit aqua bidest. verdünnt.
Zur Messung dienten folgende Eichlösungen:
K^+ - Eichreihe: 0 bis 2 mg % K^+
(2 mg % K^+ = 0,51 mval K^+/l aqua bidest)
Na^+- Eichreihe: 0 bis 1 mg % Na^+ mit 3 mg % K^+
(1 mg % Na^+ = 0,43 mval Na^+/l aqua bidest)
Der Zusatz von Kalium zur Na^+- Eichreihe erfolgte, um den stören-

den Einfluß der K^+-Ionen des Hämolysates auf die Messung der Na^+-Ionen zu korrigieren.
Mit Hilfe dieser Eichreihen wurden Eichkurven aufgestellt. Bei der Elektrolytbestimmung im Hämolysat wurde jedem gemessenen Skalenwert mit Hilfe der Eichkurve der entsprechende Wert in mg % zugeordnet, der dann in mval/l umgerechnet wurde.

Alle Werte werden in mval/l angegeben. In den Abbildungen ist die einfache Standardabweichung $\pm$ s eingezeichnet.

2.6 Hämoglobin - Bestimmung (MATTENHEIMER 1966)

Prinzip: In einer Lsg. von Kaliumferrizyanid und Kaliumzyanid wird Hämoglobin zu Methämoglobin oxidiert und in Cyan-Methämoglobin umgewandelt, das fotometrisch bestimmt wird.

Lsg.: 50 mg KCN, 200 mg $K_3Fe(CN)_6$ und 1,0 g $NaHCO_3$ auf 1 Liter aqua bidest. gelöst.

Durchführung der Bestimmung: Die Bestimmung erfolgte am Bausch & Lomb-Fotometer. Hierzu wurde 1 ml Hämolysat aus dem Überstand (Verdünnung 1:50) mit 2,5 ml Reagenz gemischt. Die Extinktion wird gegen einen Leerwert (nur Reagenz) bei 540 nm abgelesen.

Berechnung:

$$\frac{\text{Extinktion}_{\text{Probe}} \times \text{MG Hämoglobin}}{\text{molarer Extinktionskoeffizient}} \times \frac{2{,}5 + 1}{1} \times 50$$

$$= E_{\text{Probe}} \times 256{,}36 = \text{mg Hb/ml Hämolysat}$$

3 E R G E B N I S S E

Ziel dieser Arbeit ist es, mögliche Angriffspunkte der ionisierenden Strahlen zu ermitteln, um Aussagen über strukturelle Membranveränderungen zu gewinnen, die ursächlich zu den strahlenbedingten Permeabilitätsveränderungen führen. Durch chemische Reagentien mit bekanntem Reaktionsmechanismus wird zunächst versucht, die Strahlenwirkung zu imitieren. Danach wird durch Kombination von Bestrahlung und chemischen Reagentien bestimmt, ob beide Noxen sich in ihrer Wirkung addieren. Aus diesem Verhalten können dann Rückschlüsse auf die in Frage kommenden Angriffspunkte der ionisierenden Strahlung gezogen werden.

3.1 K^+-Na^+-Verschiebungen unbestrahlter und bestrahlter Erythrozyten

3.1.1 Elektrolytgehalt unbestrahlter Erythrozyten

Die Bestimmung des Elektrolytgehaltes unbehandelter, gewaschener Erythrozyten ergibt folgende Werte:

K^+ : $99{,}8 \pm 4{,}0$ mval/l ($n = 50$)

Na^+ : $19{,}7 \pm 2{,}5$ mval/l ($n = 50$)

Diese Daten stimmen mit den Angaben von Morczek gut überein (MORCZEK 1955). Für die folgenden Versuche werden diese Daten als Ausgangspunkte benutzt. Ihre Veränderung dient zur Beurteilung der Wirkung von Röntgenstrahlen und der Wirkung speziell ausgewählter membranwirksamer Agentien.

Werden gewaschene Erythrozyten in eine Suspensionslösung gegeben und 20 h bei $4^{\circ}C$ aufbewahrt, so zeigt sich ein Abfall im K^+-Gehalt von 100 auf $91{,}0 \pm 3{,}5$ mval/l ($n = 50$), also ein K^+-Verlust von etwa 10 %. Der Na^+-Gehalt ändert sich dabei nicht.

3.1.2 Elektrolytverschiebungen bei bestrahlten Erythrozyten in Abhängigkeit von der Dosis

Bestrahlte Erythrozyten, die 20 h bei 4°C suspendiert werden, zeigen einen ausgeprägten, dosisabhängigen, zusätzlichen K^+-Verlust und eine annähernd gleichgroße Na^+-Aufnahme. Im Durchschnitt ist der K^+-Verlust um 5 mval/l höher als die Na^+-Aufnahme (Abb.1).

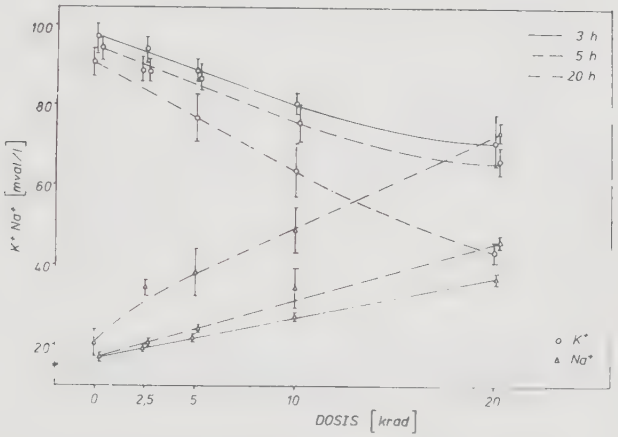


Abb.1: K^+-Verlust und Na^+-Aufnahme bestrahlter Erythrozyten bei 4°C und verschiedenen Suspensionszeiten in Abhängigkeit von der Dosis. o= K^+, ▲ = Na^+

Das Ausmaß des K^+-Verlustes und der Na^+-Aufnahme nimmt mit steigender Dosis fast linear zu (vgl. Abb.1, Tab.3). Eine Bestrahlung mit 20 krad führt zu einem K^+-Verlust von 55 % (von 100 auf 43,5 ± 2,7 mval/l) und einem Anstieg im Na^+-Gehalt von 20 auf 73,9 ± 2,4 mval/l. Auf eine Bestrahlung mit höheren Dosen wurde verzichtet, da in dieser Arbeit vornehmlich die kombinierte Wirkung von ionisierenden Strahlen und Agentien untersucht wird.

3.1.3 Elektrolytverschiebungen bei bestrahlten Erythrozyten in Abhängigkeit von der Suspensionszeit

Betrachtet man den Zeitraum in dem sich die strahlenbedingten Veränderungen vollziehen, so tritt der größte K^+-Verlust innerhalb der ersten 3 h der Suspensionszeit ein. Danach klingt der K^+-Verlust allmählich ab (Abb.2).

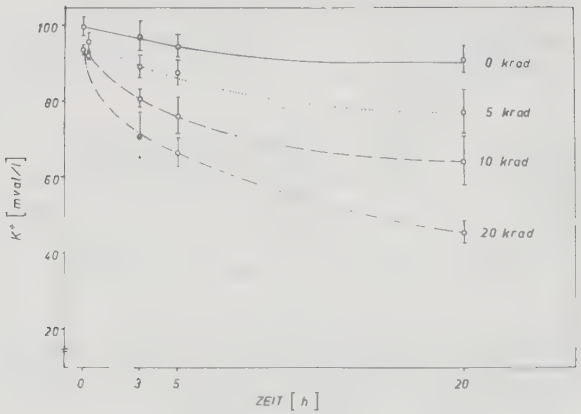


Abb.2: K^+-Verlust unbestrahlter und bestrahlter Erythrozyten in Abhängigkeit von der Suspensionszeit bei verschieden hohen Strahlendosen.

Entsprechend beobachtet man nach Bestrahlung mit 10 und 20 krad zu Beginn der Suspensionszeit auch einen stärkeren Na^+-Anstieg und eine Verlangsamung der Na^+-Aufnahme mit zunehmender Suspensionszeit. Nur nach 5 krad steigt der Na^+-Gehalt mit der Suspensionszeit linear an (Abb.3).

Ein Vergleich zwischen K^+-Verlust und Na^+-Aufnahme zeigt, daß der K^+-Verlust anfangs stärker ist als die Na^+-Aufnahme. Nach

20 h ist der Elektrolytaustausch jedoch in etwa äquivalent (2-7 mval/l Differenz). Die Ergebnisse sind zahlenmäßig in den Tabellen 1-3 zusammengefaßt.

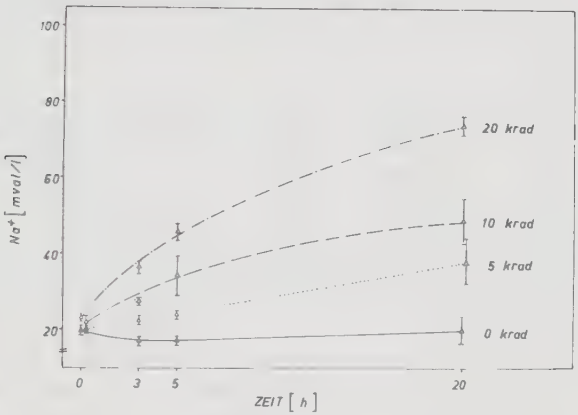


Abb.3: Na^+-Aufnahme unbestrahlter und bestrahlter Erythrozyten in Abhängigkeit von der Suspensionszeit bei verschieden hohen Strahlendosen.

Tab.1: Elektrolytverschiebungen bei bestrahlten und unbestrahlten Erythrozyten nach 3 h Suspension bei 4°C.

	Dosis (krad)	Elektrolytgehalt (mval/l) $\bar{x}$ ± s	n	Verschiebung
K^+	0	97,3 4,5	8	- 2,5
	5	88,9 2,7	8	- 1o,9
	10	8o,8 2,4	8	- 19,o
	20	71,o 6,2	8	- 28,8
Na^+	0	17,3 1,1	8	+ 2,4
	5	22,5 1,1	8	+ 2,8
	10	27,5 o,8	8	+ 7,5
	20	36,8 1,7	8	+ 17,1

Tab.2: Elektrolytverschiebungen bei bestrahlten und unbestrahlten Erythrozyten nach 5 h Suspension bei 4°C.

	Dosis (krad)	Elektrolytgehalt (mval/l) $\bar{x}$ ± s	n	Verschiebung
K^+	0	94,5 2,8	8	- 5,3
	5	87,5 3,4	8	- 12,3
	10	75,9 4,9	8	- 23,9
	20	66,4 3,5	8	- 33,4
Na^+	0	17,3 o,7	8	- 2,4
	5	24,1 o,9	8	+ 4,4
	10	34,6 5,2	8	+ 14,9
	20	46,3 2,1	8	+ 26,6

Tab.3: Elektrolytverschiebungen bei bestrahlten und unbestrahlten Erythrozyten nach 20 h Suspension bei 4°C.

	Dosis (krad)	Elektrolytgehalt (mval/l) $\bar{x}$	± s	n	Verschiebung
K^+	0	91,o	3,5	21	- 8,8
	5	77,o	6,2	14	- 22,8
	10	64,1	7,4	8	- 35,7
	20	43,5	2,7	8	- 56,3
Na^+	0	2o,7	3,5	19	+ 1,o
	5	38,5	6,1	13	+ 18,8
	10	48,5	5,8	8	+ 28,7
	20	73,9	2,4	8	+ 54,2

3.2 Elektrolytverschiebungen bei bestrahlten und unbestrahlten Erythrozyten nach Zusatz von pCMB

3.2.1 Konzentrationsabhängigkeit

Der Einfluß von Parachloromercuribenzoat (pCMB) auf den K^+- Na^+-Gehalt von bestrahlten und unbestrahlten Erythrozyten wurde im Konzentrationsbereich von 10^{-5} bis 10^{-3}M untersucht. Nach 20 h Suspension bei 4^oC wurden die Elektrolytbestimmungen durchgeführt.
Bei unbestrahlten Proben bleibt pCMB in der Konzentration von 10^{-5}M ohne Einfluß auf den K^+- Na^+-Gehalt. Eine pCMB-Konzentration von 5x 10^{-5}M führt jedoch schon zu deutlichen Verschiebungen im Elektrolytgehalt (K^+: 73 mval/l, Na^+: 36 mval/l). Bei 10^{-4}M pCMB entspricht die Veränderung im K^+- Na^+-Gehalt etwa der Schädigung durch eine Bestrahlung mit 10 krad (K^+: 61 mval/l, Na^+: 51 mval/l). Eine weitere Erhöhung der pCMB-Konzentration auf 10^{-3}M hatte eine vollständige Hämolyse zur Folge (Abb.4).

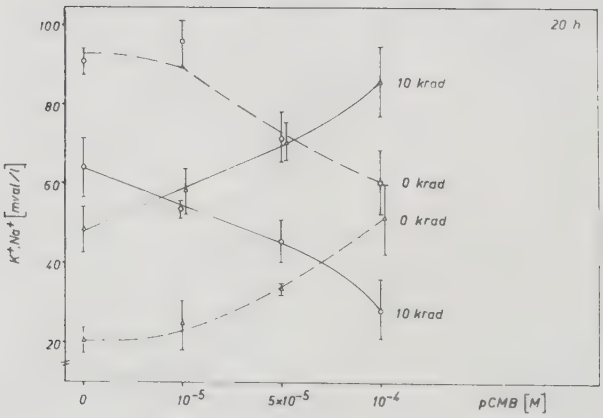


Abb.4: K^+-Na^+-Veränderungen unbestrahlter u. bestrahlter Erythrozyten in Abhängigkeit von der pCMB-Konzentration (4^oC, 20 h)
o = K^+, Δ = Na^+

Bei den mit 10 krad bestrahlten Proben ist der K^+-Gehalt bereits strahlenbedingt erniedrigt. Auffallend ist, daß hier die pCMB-Konzentration von 10^{-5}M, die bei unbestrahlten Proben noch keine Wirkung zeigt, zu zusätzlichen Elektrolytverschiebungen führt. Der K^+-Gehalt wird durch 10^{-5}M pCMB um weitere 10 mval/l erniedrigt, der Na^+-Gehalt um den gleichen Betrag erhöht. Wird nach der Bestrahlung (10 krad) mit pCMB 10^{-4}M suspendiert, so beobachtet man, daß die gemeinsame Wirkung der beiden Noxen stärker ist als die Addition ihrer Wirkungen (Abb.4, Tab.6).

3.2.2 Dosisabhängigkeit

Um genaueren Aufschluß über das Additionsverhalten der beiden Noxen zu gewinnen, wurde geprüft, wie pCMB auf die Elektrolytverschiebungen von Erythrozyten wirkt, die mit verschieden hohen Dosen bestrahlt wurden. Die Untersuchungen wurden bei einer pCMB-Konzentration von 10^{-4}M nach 5 h und nach 20 h Suspensionszeit bei 4°C durchgeführt.

Nach einer Suspensionszeit von 5 h sind die durch pCMB bedingten Elektolytverschiebungen bei unbestrahlten Erythrozyten am geringsten; bei bestrahlten Erythrozyten sind sie stärker und nehmen mit der Strahlendosis (5-20 krad) leicht zu (Abb.5).

Dagegen ist nach einer Suspensionszeit von 20 h die zusätzliche pCMB-Wirkung nach Bestrahlung mit 5 krad am ausgeprägtesten (Abb.6). Der K^+-Gehalt bestrahlter Erythrozyten (5-20 krad) liegt nach der Suspension mit pCMB zwischen 20 und 30 mval/l. Offenbar ist hier ein unterer Grenzwert erreicht. Ebenso wird nach Bestrahlung mit 5 krad und pCMB-Zusatz ein Na^+-Gehalt gemessen (85 - 90 mval/l), der sich durch höhere Strahlendosen nicht mehr steigern läßt, da die Erythrozyten zunehmend hämolysieren.

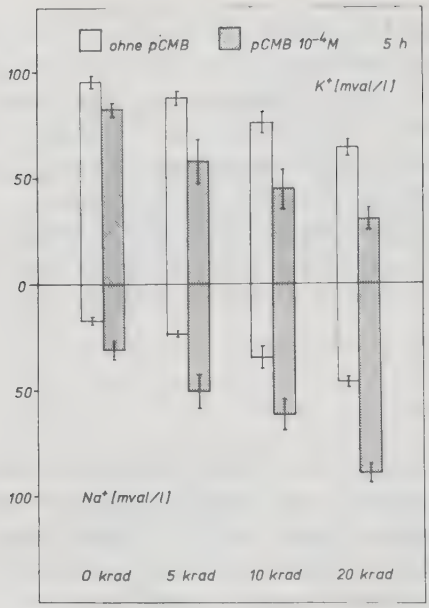


Abb.5: K^+-Na^+-Veränderungen bestrahlter, mit 10^{-4}M pCMB suspendierter Erythrozyten nach 5 h in Abhängigkeit von der Strahlendosis.

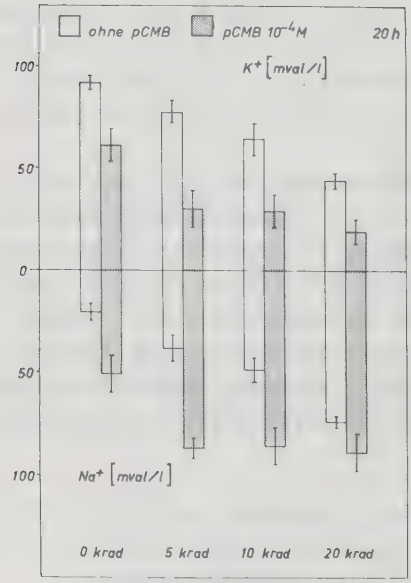


Abb.6: K^+-Na^+-Veränderungen bestrahlter, 2o h mit 10^{-4}M pCMB suspendierter Erythrozyten in Abhängigkeit von der Strahlendosis.

3.2.3 Zeitabhängigkeit

Diese Meßreihe wurde durchgeführt, um Aufschluß über die Kinetik der Wirkung von pCMB zu erhalten. Während der Suspensionszeit wurden stündlich Proben entnommen.

Hierbei zeigte sich, daß die durch pCMB (10^{-4}M) hervorgerufene Veränderung der Membranpermeabilität sich bei unbestrahlten Erythrozyten während der ganzen Suspensionszeit auswirkt. Die stärksten Elektrolytverschiebungen finden sich jedoch innerhalb der ersten fünf Stunden (Abb.7).

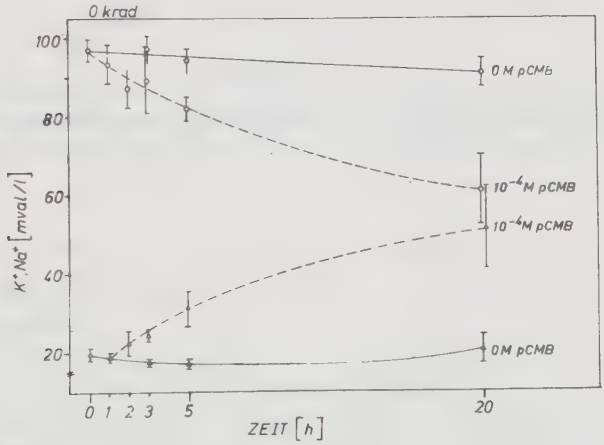


Abb.7: Zeitabhängigkeit der Elektrolytverschiebungen unbestrahlter Erythrozyten mit und ohne pCMB-Zusatz. o = K^+, Δ = Na^+

Auch bei bestrahlten und anschließend mit 10^{-4}M pCMB suspendierten Erythrozyten zeigt sich das Maximum der pCMB-Wirkung in den ersten fünf Stunden. Während der weiteren Suspensionszeit nimmt das Ausmaß der pCMB-bedingten Elektrolytverschiebungen stark ab; mit 10 und 20 krad bestrahlte Erythrozyten zeigen sogar geringere

Veränderungen als unbestrahlte, gleichfalls mit 10^{-4}M pCMB behandelte Erythrozyten (Abb.8-10).

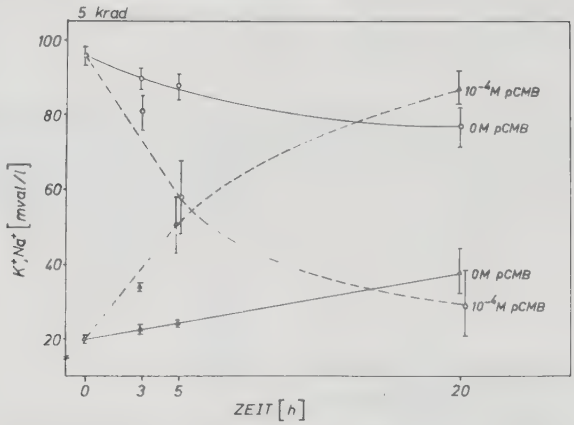


Abb.8: Zeitabhängigkeit der Elektrolytverschiebungen bestrahlter Erythrozyten (5 krad) mit und ohne pCMB-Zusatz.
o = K^+, Δ = Na^+.

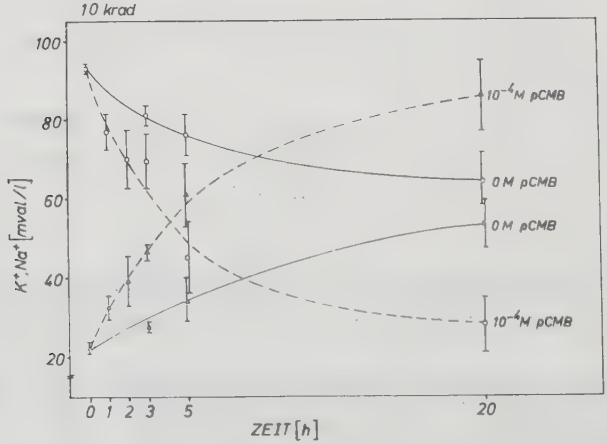


Abb.9: Zeitabhängigkeit der Elektrolytverschiebungen bestrahlter Erythrozyten (10 krad) mit und ohne pCMB-Zusatz.
o = K^+, Δ = Na^+.

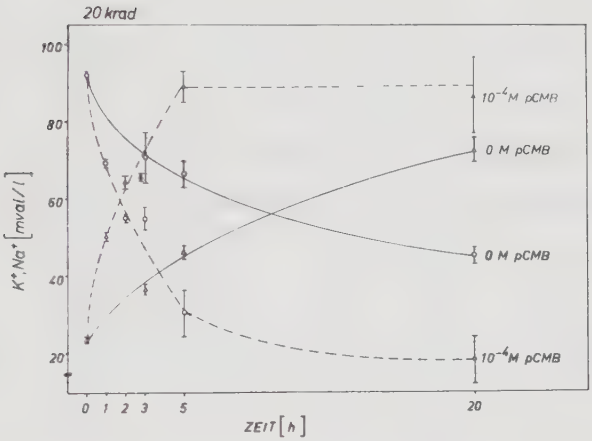


Abb.10: Zeitabhängigkeit der Elektrolytverschiebungen bestrahlter Erythrozyten (20 krad) mit und ohne pCMB-Zusatz 10^{-4}M. o = K^+, Δ = Na^+.

3.2.4 Zusammenfassung

pCMB bewirkt Veränderungen im Elektrolytgehalt von Erythrozyten. Dieser Einfluß zeigt sich ab einer Konzentration von 5x 10^{-5}M pCMB. Nach Bestrahlung tritt er schon bei 10^{-5}M pCMB auf. Die Bestrahlung bewirkt also eine Sensibilisierung der Erythrozyten gegenüber pCMB. Dieser Effekt ist nach 5 h Suspension mit 10^{-4}M pCMB eindeutig feststellbar; zugleich zeigt sich, daß mit höheren Strahlendosen die pCMB-Wirkung größer wird (Tab.5). Nach 20 h Suspension kann ein Sensibilisierungseffekt nur nach 5 und 10 krad beobachtet werden. Nach 20 krad ist der K^+-Gehalt strahlenbedingt schon so tief gesunken, daß der potentiell mögliche pCMB-Effekt nicht mehr voll zum tragen kommt.

Tab.4: Elektrolytverschiebungen bei bestrahlten und unbestrahlten Erythrozyten nach 3 h Suspension mit pCMB 10^{-4}M bei 4^{o}C.

	Dosis (krad)	Elektrolytgehalt (mval/l) mit pCMB-Zusatz $\bar{x}$	± s	n	ohne pCMB-Zusatz $\bar{x}$	± s	n	pCMB-bedingt
K^+	0	85,5	7,o	6	97,3	4,5	8	- 11,7
	5	8o,8	4,6	4	88,9	2,7	8	- 8,1
	10	69,6	6,9	8	8o,8	2,4	8	- 11,2
	20	54,9	3,3	4	71,o	6,2	8	- 16,1
Na^+	0	24,4	1,6	8	17,3	o,7	8	+ 7,1
	5	34,1	o,6	4	22,5	1,1	8	+ 11,6
	10	46,3	1,9	7	27,5	o,8	8	+ 18,8
	20	65,5	1,5	4	36,8	1,7	8	+ 28,7

Tab.5: Elektrolytverschiebungen bei bestrahlten und unbestrahlten Erythrozyten nach 5 h Suspension mit pCMB 10^{-4}M bei 4^{o}C.

	Dosis (krad)	Elektrolytgehalt (mval/l) mit pCMB-Zusatz $\bar{x}$	± s	n	ohne pCMB-Zusatz $\bar{x}$	± s	n	pCMB-bedingt
K^+	0	82,o	3,1	8	94,5	2,8	8	- 12,5
	5	57,9	9,7	12	87,5	3,4	8	- 29,6
	10	45,2	9,o	11	75,9	4,9	8	- 3o,7
	20	3o,6	6,3	4	66,4	3,5	8	- 35,8
Na^+	0	31,5	3,9	8	17,3	o,7	8	+ 14,2
	5	5o,7	7,5	12	24,1	o,9	8	+ 26,6
	10	61,1	7,9	16	34,6	5,2	8	+ 26,5
	20	89,o	4,2	4	46,3	2,1	8	+ 42,7

Tab.6: Elektrolytverschiebungen bei bestrahlten und unbestrahlten Erythrozyten nach 2o h Suspension bei $4^{o}C$ mit pCMB $10^{-4}M$.

	Dosis (krad)	Elektrolytgehalt (mval/l) mit pCMB-Zusatz $\bar{x}$	± s	n	ohne pCMB-Zusatz $\bar{x}$	± s	n	pCMB-bedingt
K^+	0	6o,6	8,1	14	91,o	3,5	21	- 3o,4
	5	29,6	8,7	1o	77,o	6,2	14	- 47,4
	10	28,4	7,5	12	64,1	7,4	8	- 35,7
	20	18,6	5,6	6	43,5	2,7	8	- 24,9
Na^+	0	51,3	8,9	14	2o,7	3,5	19	+ 3o,6
	5	86,8	5,o	8	38,5	6,1	13	+ 48,3
	10	85,8	9,o	12	48,5	5,8	8	+ 37,3
	20	88,6	9,3	6	73,9	2,4	8	+ 14,7

3.3 Elektrolytverschiebungen bei Erythrozyten nach Zusatz von NEM

3.3.1 Konzentrationsabhängigkeit

Ein Zusatz von NEM in Konzentrationen von 10^{-5} - 10^{-3}M zu Suspensionen bestrahlter und unbestrahlter Erythrozyten zeigt innerhalb der Beobachtungszeit von 20 h keinerlei Einfluß auf deren Elektrolytgehalt. Erst eine Erhöhung der NEM-Konzentration in der Suspension auf 10^{-2}M führt zu starken Veränderungen in der Ionenkonzentration der Erythrozyten (Abb.11).

Unbestrahlte Erythrozyten zeigen nach 20 h Suspension in 10^{-2}M NEM-Lösung einen K^+-Verlust von über 50 mval/l, also einen Verlust von mehr als 50 %, und eine Na^+-Aufnahme von ebenfalls etwa 50mval/l. Die Ionenverschiebungen dieser unbestrahlten Proben (NEM 10^{-2}M) sind etwa so stark, wie nach einer Bestrahlung mit 20 krad (K^+: 43,5, Na^+: 73,9 mval/l).

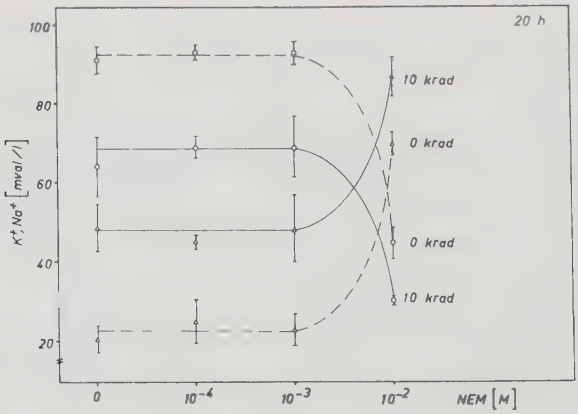


Abb.11: K^+-Na^+-Gehalt unbestrahlter und bestrahlter Erythrozyten nach 20 h Suspension in Abhängigkeit von der NEM-Konzentration. o = K^+, Δ = Na^+

Eine Bestrahlung mit 10 krad führt nach 20 h Suspension ohne Zusatz von NEM zu einem K^+-Verlust von etwa 35 mval/l. Wird allerdings nach Bestrahlung (10 krad) in 10^{-2}M NEM suspendiert, so sinkt der K^+-Gehalt um weitere 35 mval/l ab. Diesem K^+-Verlust entspricht eine etwa äquivalente Na^+-Aufnahme.

3.3.2 Dosisabhängigkeit

Vergleicht man die Elektrolytverschiebungen, die bei bestrahlten und unbestrahlten Erythrozyten nach Suspension mit NEM (10^{-2}M) auftreten, mit den alleine durch die Bestrahlung ausgelösten Elektrolytveränderungen, so stellt man fest, daß die größte NEM-Wirkung bei unbestrahlten Erythrozyten auftritt. Mit steigender Dosis wird der zusätzliche NEM-Effekt geringer (Abb.12 und Tab.9).

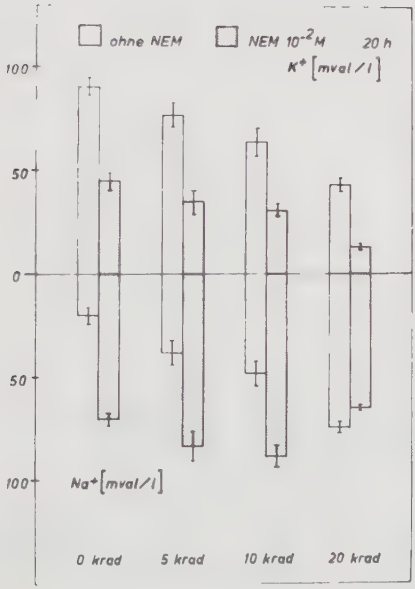


Abb.12: Unterschiede im K^+-Na^+-Gehalt von Erythrozyten in Abhängigkeit von der Dosis nach 20 h Suspension mit und ohne Zusatz von 10^{-2}M NEM.

Nach Bestrahlung mit 20 krad und Suspension in NEM 10^{-2}M ist der Na^+-Gehalt der Erythrozyten niedriger als bei nur bestrahlten Erythrozyten. Diese Proben zeigen schon starke Hämolyse. Die Zellen enthalten jedoch fünfmal soviel Na^+wie K^+-Ionen; dagegen ist das Verhältnis Na^+: K^+ bei nur mit 20 krad bestrahlten Proben etwa 2:1.

3.3.3 Zeitabhängigkeit

Die folgenden Versuche wurden durchgeführt, um in Erfahrung zu bringen, in welchem Zeitraum die NEM-bedingten Elektrolytverschiebungen stattfinden.
Der Zusatz von 10^{-2}M NEM zu Suspensionen unbestrahlter Erythrozyten hat einen nahezu gleichmäßigen K^+-Verlust während der ganzen Suspensionszeit (20 h) und eine entsprechende Na^+-Aufnahme zur Folge (Abb.13).

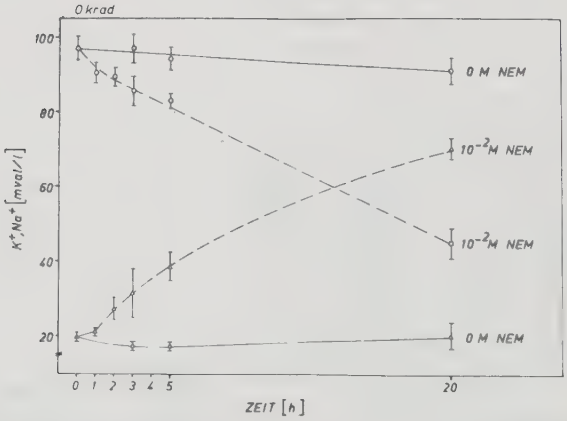


Abb.13: Elektrolytverschiebungen von Erythrozyten in Abhängigkeit von der Suspensionszeit ohne und mit NEM (10^{-2}M). o = K^+, Δ = Na^+

Nach Bestrahlung und Zusatz von NEM (10^{-2}M) während der Suspensionszeit liegt nach kurzen Zeiten der K^+-Gehalt, NEM-bedingt, schon etwas unter den Werten, die durch die Bestrahlung alleine erreicht werden. Dieser NEM-bedingte K^+-Verlust wird mit zunehmender Dosis nicht stärker.
Die NEM-Wirkung auf den Elektrolytgehalt der Erythrozyten hält hier, wie bei unbestrahlten Erythrozyten über die gesamte Suspensionszeit an. Nach Bestrahlung und NEM-Zusatz sind die Veränderungen jeweils stärker und nehmen im Laufe der Zeit ständig zu. Nach 20 h Suspension sind also die Unterschiede im Elektrolytgehalt bestrahlter Proben mit und ohne NEM am größten. (Abb.14-16 und Tab. 7-9).

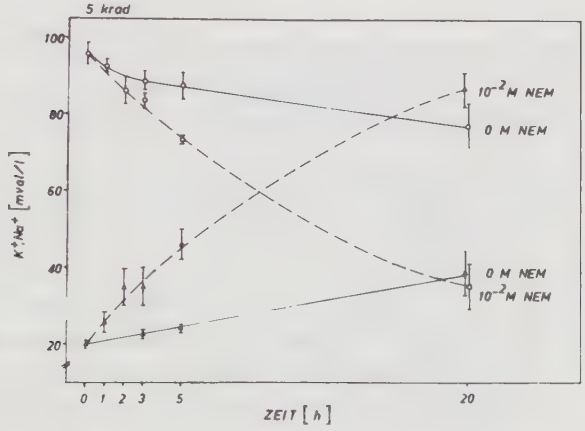


Abb.14: Elektrolytverschiebungen von bestrahlten Erythrozyten (5 krad) in Abhängigkeit von der Suspensionszeit ohne und mit NEM (10^{-2}M). o = K^+, Δ = Na^+

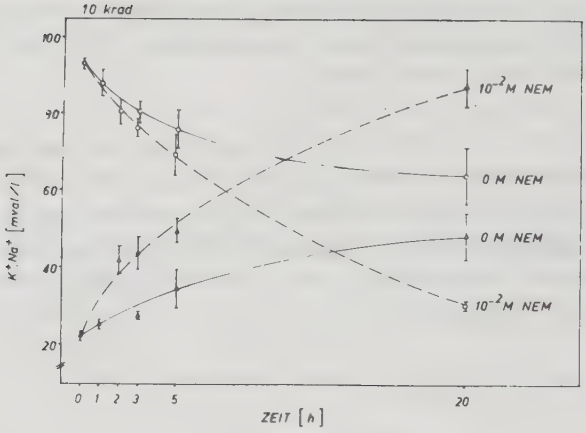


Abb.15: Elektrolytverschiebungen von bestrahlten Erythrozyten (10 krad) in Abhängigkeit von der Suspensionszeit ohne und mit 10^{-2}M NEM-Zusatz. o= K^+, Δ = Na^+.

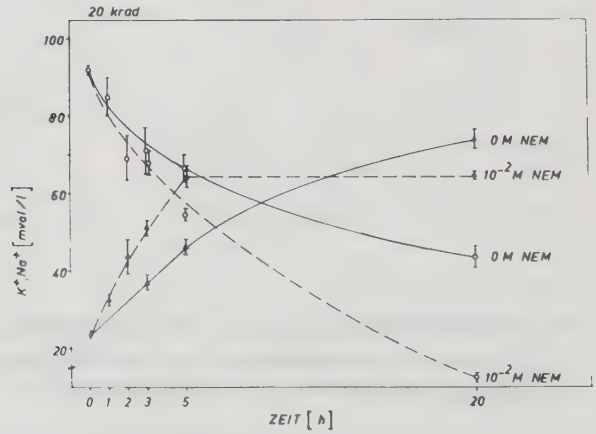


Abb.16: Elektrolytverschiebungen bestrahlter Erythrozyten (20 krad) in Abhängigkeit von der Suspensionszeit ohne und mit 10^{-2}M NEM-Zusatz. o = K^+, Δ = Na^+.

Vergleicht man die NEM-bedingten K^+- und Na^+-Verschiebungen miteinander, so kann man feststellen, daß die NEM-bedingte Na^+-Aufnahme in den ersten Stunden der Suspension stärker ist als der durch NEM verursachte K^+-Verlust. Nach 20 h sind NEM-bedingte Na^+-Aufnahme und K^+-Verlust etwa gleich. Im Gegensatz zu den Elektrolytverschiebungen nach Bestrahlung, bei denen zu Beginn der K^+-Verlust stärker ist als die Na^+-Aufnahme, wird durch NEM anfangs die Na^+-Aufnahme mehr beeinflußt, sie ist stärker. Betrachtet man die Summe der Kationen (K^+u. Na^+) nach Bestrahlung und NEM-Behandlung, so zeigt sich, daß dieser Wert in der gleichen Größenordnung (115 - 120 mval/l) erhalten bleibt; d.h. der nur durch Bestrahlung bedingte anfangs stärkere K^+-Verlust wird bei den zusätzlich mit NEM-behandelten Proben durch eine anfangs stärkere Na^+-Aufnahme ausgeglichen.

3.3.4. Zusammenfassung

NEM bleibt bis zu einer Konzentration von 10^{-3}M ohne Einfluß auf den Elektrolytgehalt von Erythrozyten. NEM 10^{-2}M führt sowohl bei bestrahlten wie bei unbestrahlten Erythrozyten zu deutlichen Verschiebungen im Elektrolytgehalt. Diese Wirkung ist am ausgeprägtesten bei unbestrahlten Erythrozyten und nimmt bei bestrahlten Erythrozyten mit steigender Dosis ab. Das kann bedeuten, daß der NEM-bedingte K^+-Verlust vom "K^+-Ausgangsgehalt" der Proben beeinflußt wird. Die NEM-bedingten Elektrolytverschiebungen erfolgen kontinuierlich während der ganzen Suspensionszeit, wobei die Na^+-Aufnahme initial stärker ist.

Tab.7: Elektrolytverschiebungen bei bestrahlten und unbestrahlten Erythrozyten nach 3 h Suspension mit NEM 10^{-2}M bei 4°C.

	Dosis (krad)	Elektrolytgehalt (mval/l) mit NEM-Zusatz $\bar{x}$	± s	n	ohne NEM-Zusatz $\bar{x}$	± s	n	NEM-bedingt
K^+	0	85,5	4,o	8	97,3	4,5	8	- 11,7
	5	83,8	2,2	4	88,9	2,7	8	- 5,1
	10	76,2	2,5	8	8o,8	2,4	8	- 4,6
	20	67,9	3,o	4	71,o	6,2	8	- 3,1
Na^+	0	31,6	6,4	8	17,3	o,7	8	+ 14,3
	5	34,9	4,7	4	22,5	1,1	8	+ 12,4
	10	43,8	4,3	8	27,5	o,8	8	+ 16,3
	20	5o,9	2,1	4	36,8	1,7	8	+ 14,1

Tab.8: Elektrolytverschiebungen bei bestrahlten und unbestrahlten Erythrozyten nach 5 h Suspension mit NEM 10^{-2}M bei 4°C.

	Dosis (krad)	Elektrolytgehalt (mval/l) mit NEM-Zusatz $\bar{x}$	± s	n	ohne NEM-Zusatz $\bar{x}$	± s	n	NEM-bedingt
K^+	0	83,o	2,o	8	94,5	2,8	8	- 11,5
	5	73,6	o,6	4	87,5	3,4	8	- 13,9
	10	69,5	5,3	8	75,9	4,9	8	- 6,4
	20	54,5	1,5	4	66,4	3,5	8	- 11,9
Na^+	0	38,6	3,7	8	17,3	o,7	8	+ 21,5
	5	46,1	4,4	4	24,1	o,9	8	+ 22,o
	10	49,6	3,1	8	34,6	5,2	8	+ 15,o
	20	64,3	2,6	4	46,3	2,1	8	+ 18,o

Tab.9: Elektrolytverschiebungen bei bestrahlten und unbestrahlten Erythrozyten nach 20 h Suspension mit NEM 10^{-2}M bei 4°C.

	Dosis (krad)	Elektrolytgehalt (mval/l) mit NEM-Zusatz $\bar{x}$	± s	n	ohne NEM-Zusatz $\bar{x}$	± s	n	NEM-bedingt
K^+	0	45,2	3,9	12	91,o	3,5	21	- 45,8
	5	35,o	6,o	4	77,o	6,2	14	- 42,o
	10	3o,7	1,o	8	64,1	7,4	8	- 33,4
	20	12,8	1,o	2	43,5	2,7	8	- 3o,6
Na^+	0	7o,2	2,9	12	2o,7	3,5	19	+ 49,5
	5	82,6	7,4	4	38,5	6,1	13	+ 44,1
	10	87,2	4,9	8	48,5	5,8	8	+ 38,7
	20	64,5	1,o	2	73,9	2,4	8	- 9,4

3.4 Elektrolytverschiebungen bei Erythrozyten nach Zusatz von NBS

3.4.1 Konzentrationsabhängigkeit

Die Wirkung von N-Bromsuccinimid (NBS) auf den Elektrolytgehalt von Erythrozyten wurde für den Konzentrationsbereich von 10^{-5}M bis 10^{-3}M untersucht.

Bis zu einer NBS-Konzentration von 10^{-4}M in der Suspensionslösung läßt sich kaum ein Einfluß feststellen. Eine Konzentration von 10^{-3}M bewirkt innerhalb von 20 h bei unbestrahlten Erythrozyten einen K^+-Verlust von 25 mval/l gegenüber den Ausgangswerten und eine Na^+-Aufnahme von nur etwa 4 mval/l. Das Ausmaß dieses K^+-Verlustes kommt der Wirkung einer Strahlendosis von 5 krad gleich, wogegen der Na^+-Gehalt durch NBS kaum beeinflußt wird. (Abb. 17)

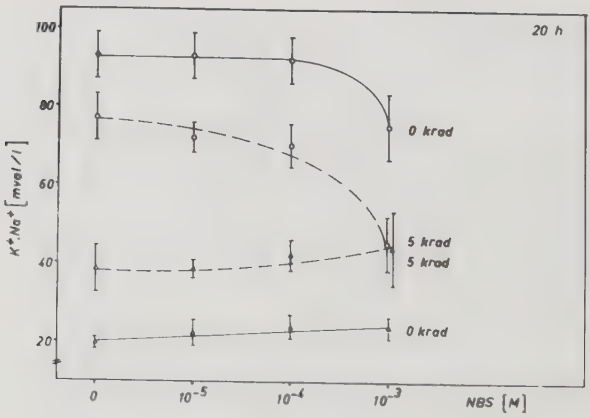


Abb.17: K^+-Na^+-Gehalt unbestrahlter und bestrahlter Erythrozyten in Abhängigkeit von der NBS-Konzentration nach 20 h Suspension bei 4°C. o = K^+ Δ = Na^+

Nach Bestrahlung mit 5 krad weisen die Erythrozyten nach 20 h im Mittel einen K^+-Gehalt von 77 mval/l und einen Na^+-Gehalt von 38,5 mval/l auf. Wird nach der Bestrahlung mit 10^{-3}M NBS-Zusatz suspendiert, so sinkt die K^+-Konzentration um weitere 33 mval/l ab, während die Na^+-Konzentration nur um zusätzliche 6 mval/l ansteigt. Offensichtlich bleibt also NBS auch auf den Na^+-Gehalt bestrahlter Erythrozyten ohne Einfluß.

3.4.2 Dosisabhängigkeit

Da sich sowohl bei pCMB wie auch bei NEM gezeigt hat, daß der Einfluß dieser Substanzen auf den Elektrolytgehalt der Erythrozyten von der Dosis der vorhergehenden Bestrahlung abhängt, liegt es nahe zu untersuchen, ob dieses Phänomen auch bei NBS auftritt.

Ein Vergleich der Elektrolytverschiebungen, die durch Kombination von Bestrahlung und NBS 10^{-3}M hervorgerufen werden, mit den nur durch Bestrahlung ausgelösten zeigt, daß die NBS-Wirkung ebenfalls durch die Bestrahlung beeinflußt wird (Abb. 18)

Nach 20 h Suspensionszeit ist die geringste NBS-Wirkung bei unbestrahlten Erythrozyten festzustellen. Bei bestrahlten Erythrozyten nimmt die Wirkung mit steigender Dosis zu. Die maximal zu beobachtende NBS-Wirkung wird nach Bestrahlung mit 10 krad erreicht und durch Dosisverdopplung auf 20 krad und NBS-Zusatz nicht überschritten. In diesem Bereich findet bereits eine starke Hämolyse statt. Der zusätzliche NBS-induzierte K^+-Verlust nimmt hier wieder ab. Eine zusätzlich Wirkung von NBS auf Erythrozyten ist also nur bis zu einem bestimmten Grad der Strahlenschädigung möglich. Da der Abfall der K^+-Konzentration nicht durch eine entsprechende Na^+-Aufnahme ausgeglichen wird, sinkt der Gesamtelektrolytgehalt der Erythrozyten.

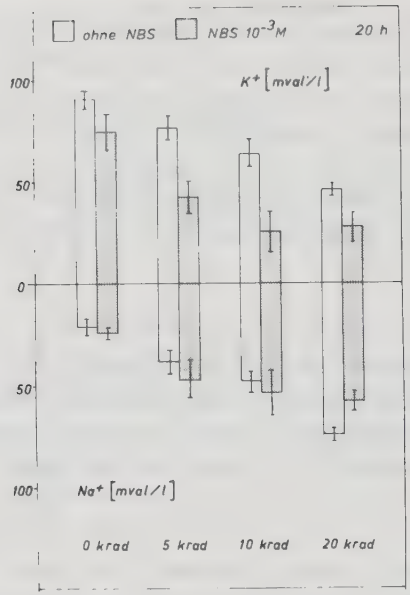


Abb.18: Unterschiede im K^+-Na^+-Gehalt von Erythrozyten in Abhängigkeit von der Dosis nach 20 h Suspension mit und ohne NBS-Zusatz.

3.4.3 Zeitabhängigkeit

Bei unbestrahlten Erythrozyten bewirkt NBS 10^{-3}M den größten K^+-Verlust (15 mval/l) innerhalb der ersten 3 h der Suspension. Danach, bis 20 h sinkt der K^+-Gehalt nur noch langsam um weitere 10 mval/l ab. Der Na^+-Gehalt steigt dagegen während der ganzen Suspensionszeit nur um 4 mval/l an (Abb. 19).

Bestrahlung mit 5 krad und Suspension mit 10^{-3}M NBS hat im Suspensionszeitraum von 20 h eine gleibleibende K^+-Verlustrate zur Folge (Abb. 20). Nach Bestrahlung mit 10 und 20 krad fällt der K^+-Gehalt innerhalb der ersten drei Stunden am stärksten ab. In der nachfolgenden Suspensionszeit verlangsamt sich die K^+-Verlustrate (Abb. 21 u. 22). Die geringe Na^+-Aufnahme verläuft nach Bestrahlung mit 5 und 10 krad langsam, nach 20 krad relativ schnell.

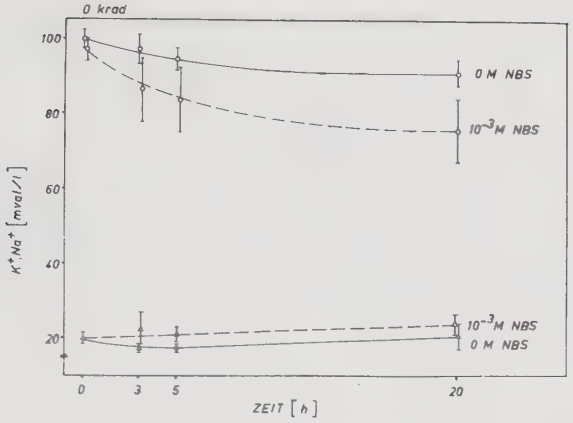


Abb.19: Elektrolytverschiebungen von Erythrozyten in Abhängigkeit von der Suspensionszeit mit und ohne 10^{-3}M NBS. o = K^+, Δ = Na^+.

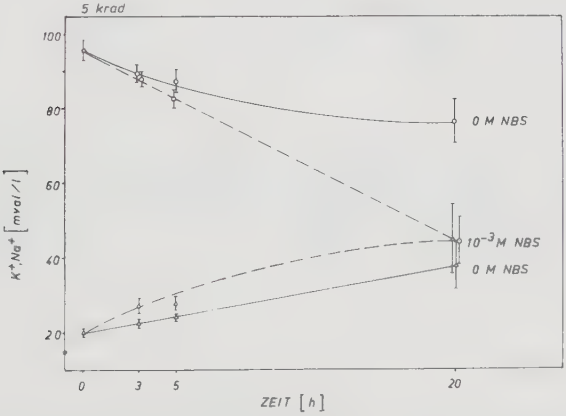


Abb.20: Elektrolytverschiebungen von bestrahlten Erythrozyten (5 krad) in Abhängigkeit von der Suspensionszeit ohne und mit 10^{-2}M NEM. o = K^+, Δ = Na^+.

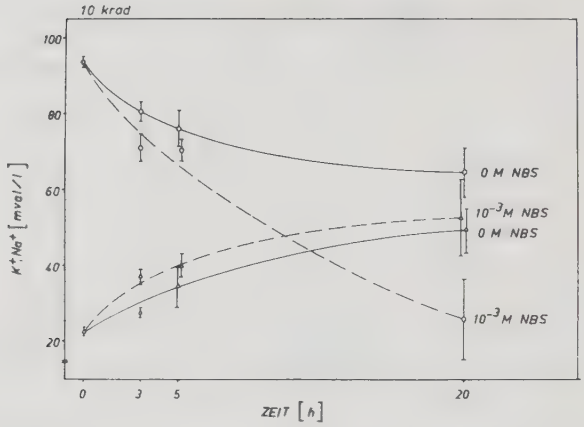


Abb.21: Elektrolytverschiebungen von Erythrozyten in Abhängigkeit von der Suspensionszeit ohne und mit NEM 10^{-2}M. o = K^+, Δ = Na^+.

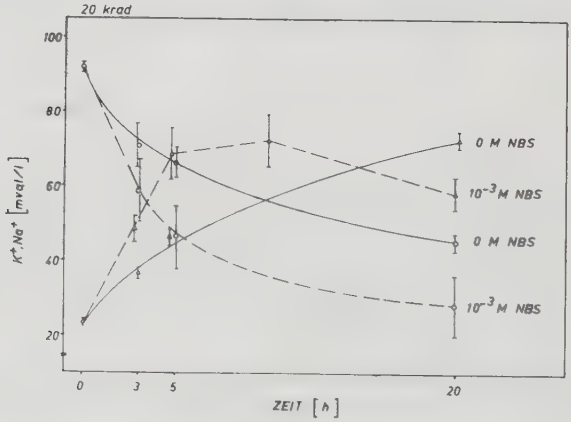


Abb.22: Elektrolytverschiebungen von bestrahlten Erythrozyten (20 krad) in Abhängigkeit von der Suspensionszeit ohne und mit 10^{-2}M NEM-Zusatz. o = K^+, Δ = Na^+.

Untersucht man jetzt, inwieweit NBS diese Elektrolytveränderungen beeinflußt hat, so stellt man fest, daß mit zunehmender Dosis der NBS-bedingte K^+-Verlust früher eintritt:
Nach Bestrahlung mit 5 krad ist bis zur 5. h der NBS-bedingte K^+-Verlust gering. Er tritt erst danach deutlich in Erscheinung.
Nach Bestrahlung mit 10 krad ist der NBS-bedingte K^+- Verlust während der ganzen Suspensionszeit gleich stark.
Nach 20 krad beträgt die durch NBS verursachte K^+-Abgabe nach 5 h schon ungefähr 20 mval/l; in der folgenden Suspensionszeit ist der K^+-Verlust nur noch etwa so groß wie nach reiner Bestrahlung mit 20 krad.

Die zusätzliche NBS-induzierte Na^+-Aufnahme bei bestrahlten Erythrozyten erfolgt nach 5 und 10 krad im wesentlichen innerhalb der ersten fünf Stunden. Nach 2o krad findet man initial einen beträchtlichen Na^+-Anstieg, der auf NBS zurückzuführen ist. Dann verlangsamt sich die Na^+-Aufnahme sehr schnell und während der zweiten Hälfte der Suspensionszeit setzt ein Na^+-Verlust ein, so daß der Na^+-Gehalt der Erythrozyten nach 20 h niedriger ist als bei nur bestrahlten Erythrozyten. Damit verbunden tritt eine starke Hämolyse auf.

Zusammenfassend kann man sagen, daß nicht nur die maximale NBS-Wirkung von der Dosis der vorhergehenden Bestrahlung abhängt, sondern auch der Zeitpunkt, an dem NBS sein jeweiliges Wirkungsmaximum erreicht.

3.4.4 Hämolyse durch NBS

Die folgenden Versuche wurden durchgeführt um festzustellen, inwieweit osmotische Phänomene bei der durch NBS bedingten Hämolyse beteiligt sind. Die Ergebnisse aus den Elektrolytbestimmungen im Erythrozytensediment (die auffallend geringe Na^+-Aufnahme), legten die Vermutung nahe, daß für die NBS-bedingte Hämolyse eine osmotische Schwellung ausgelöst durch Na^+-Ionen und H_2O-Aufnahme ausgeschlossen werden kann, und ein grundsätzlich anderer Mechanismus verantwortlich sein muß.

Eine osmotische Hämolyse läßt sich durch Suspension der Erythrozyten in einer Cholinchloridlösung weitgehend vermeiden (JAKOB u. JANDL 1961). Die strahenbedingte Hämolyse wird ebenso wie die durch pCMB und NEM verursachte Hämolyse durch osmotische Phänomene ausgelöst (JAKOB u. JANDL 1961, KOLLMANN, SHAPIRO u. MARTIN 1969).

Es wurden deshalb unbestrahlte und mit 5 krad bestrahlte Erythrozyten in NaCl- und in Cholinchlorid-Lösung mit einem Zusatz von jeweils 10^{-3}M NBS bei 4^{o}C während 2o h suspendiert. Nach abzentrifugieren der Erythrozyten konnte im Überstand das durch Hämolyse freigesetzte Hämoglobin bestimmt werden. Diese Messungen dienen zur Ermittlung der unterschiedlichen Hämolyse in den verschiedenen Suspensionen. Die Ergebnisse zeigen, daß die NBS bedingte Hämolyse durch Suspension in Cholinchloridlösung praktisch nicht beeinflußt wird. Daraus darf gefolgert werden, daß NBS in 10^{-3}M Konzentration zu erheblichen Membranveränderungen führt, als deren Folge K^+-Verlust und Hämolyse eintreten. Die Zelle wird also im wesentlichen zerstört, während Noxen, die die Membran so verändern , daß es zu K^+-Verlusten und zu einer Na^+-Aufnahme kommt, vornehmlich die Permeabilitätsfunktion stören, wobei die Zelle als Ganzes erhalten bleibt.

Tab.10: Elektrolytverschiebungen bei bestrahlten und unbestrahlten Erythrozyten nach 3 h Suspension mit NBS 10^{-3}M bei 4°C.

	Dosis (krad)	Elektrolytgehalt (mval/l) mit NBS-Zusatz $\bar{x}$	± s	n	ohne NBS-Zusatz $\bar{x}$	± s	n	NBS-bedingt
K^+	0	85,9	8,5	6	97,3	4,5	8	- 11,5
	5	88,5	1,7	4	88,9	2,7	8	- o,4
	10	7o,9	3,7	4	8o,8	2,4	8	- 9,8
	20	58,5	8,6	8	71,o	6,2	8	- 12,5
Na^+	0	22,7	4,4	6	17,3	o,7	8	+ 5,4
	5	27,4	2,1	4	22,5	1,1	8	+ 4,9
	10	37,2	2,2	4	27,5	o,8	8	+ 9,7
	20	48,3	3,3	8	36,8	1,7	8	+ 11,5

Tab.11: Elektrolytverschiebungen bei bestrahlten und unbestrahlten Erythrozyten nach 5 h Suspension mit NBS 10^{-3}M bei 4°C.

	Dosis (krad)	Elektrolytgehalt (mval/l) mit NBS-Zusatz $\bar{x}$	± s	n	ohne NBS-Zusatz $\bar{x}$	± s	n	NBS-bedingt
K^+	0	83,5	8,3	8	94,5	2,8	8	- 11,o
	5	82,4	2,7	4	87,5	3,4	8	- 5,1
	10	7o,4	2,5	4	75,9	4,9	8	- 5,5
	20	45,9	8,7	12	66,4	3,5	8	- 2o,5
Na^+	0	2o,7	2,o	8	17,3	o,7	8	+ 3,5
	5	27,1	2,4	4	24,1	o,9	8	+ 3,o
	10	39,8	3,2	4	34,6	5,2	8	+ 5,2
	20	68,5	7,1	12	46,3	2,1	8	+ 22,2

Tab.12: Elektrolytverschiebungen bei bestrahlten und unbestrahlten Erythrozyten nach 2o h Suspension mit NBS 10^{-3}M bei 4°C.

	Dosis (krad)	Elektrolytgehalt (mval/l) mit NBS-Zusatz $\bar{x}$	± s	n	ohne NBS-Zusatz $\bar{x}$	± s	n	NBS-bedingt
K^+	0	75,1	8,5	8	91,o	3,5	21	- 15,9
	5	44,1	6,8	1o	77,o	6,2	14	- 32,9
	10	25,4	1o,8	6	64,1	7,4	8	- 38,4
	20	28,1	7,6	8	43,5	2,7	8	- 3o,6
Na^+	0	23,7	2,8	8	2o,7	3,5	19	+ 3,o
	5	45,1	8,8	1o	38,5	6,1	13	+ 6,6
	10	52,5	1o,7	6	48,5	5,8	8	+ 4,o
	20	58,o	4,6	6	73,9	2,4	8	- 15,9

3.4.5 Zusammenfassung

NBS 10^{-3}M führt bei bestrahlten und unbestrahlten Erythrozyten zu einem K^+-Verlust, der nicht durch eine entsprechende Na^+-Aufnahme ausgeglichen wird. Das hat zur Folge, daß der Gesamtelektrolytgehalt absinkt.

Die Wirkung von NBS ist am geringsten bei unbestrahlten Erythrozyten, und nimmt mit steigender Dosis bis 1o krad Bestrahlung zu. Das Ausmaß der Elektrolytverschiebungen, das durch 10 krad und 2o h Suspension mit 10^{-3}M NBS erreicht wird, kann durch 20 krad und entsprechende Suspension nicht überschritten werden. Es läßt sich jedoch auch nach 20 krad Bestrahlung eine weitere NBS-Wirkung auf Erythrozyten feststellen , da der K^+-Verlust hier wesentlich schneller erfolgt.

Untersuchungen über die durch NBS verursachte Hämolyse ergaben,daß diese im wesentlichen nicht durch osmotische Phänomene bedingt ist.

4 DISKUSSION

4.1 Ermittelte Werte

Die im Verlauf dieser Arbeit ermittelten Normalwerte für den K^+- und Na^+-Gehalt von Erythrozyten stimmen mit den Literaturdaten sehr gut überein. Auch die strahlenbedingten Elektrolytverschiebungen können mit den Angaben anderer Autoren gut verglichen werden (MORCZEK 1955, MYERS u. BIDE 1966, u.a.). Diese Übereinstimmung der Daten zeigt, daß die angewandte Methodik von der Gewinnung der Erythrozyten bis zur flammenfotometrischen Analyse den üblichen Anforderungen voll gerecht wird. Die größten Standardabweichungen (s) finden sich wie zu erwarten: a) bei nur geringer Anzahl von Messungen und b) an den Knickstellen der Kurven, wo geringe Verschiebungen auf der Abszisse schon große Veränderungen der Ordinate nach sich ziehen.

4.2 Die Imitation der Strahlenwirkung

Wie ionisierende Strahlen im Bereich von 5 - 20 krad, so führen auch die 3 Agentien pCMB, NEM und NBS zu qualitativ gleichen Elektrolytverschiebungen: zu K^+-Verlusten und zu Na^+-Aufnahme. Die quantitativen und zeitlichen Vergleiche führen jedoch schon hier zu charakteristischen Abweichungen.

Die pCMB-Wirkung ist am ehesten mit verschieden hohen Dosen von Röntgenstrahlen zu vergleichen (10^{-4}M pCMB = 10 krad). Eine höhere pCMB Dosierung führt ebenso wie hohe Strahlendosen zur Hämolyse. Die Ionenverschiebungen erfolgen zwar über den gesamten Zeitraum von 20 h, wobei jedoch wiederum wie nach Röntgenbestrahlung der stärkste Effekt in den ersten 5 h zu finden ist.

NEM zeigt erst in hoher Dosierung einen Einfluß auf den Elektrolytgehalt der Erythrozyten. Dem Dosisbereich von 0 - 20 krad

entspricht etwa der enge Konzentrationsbereich von 5×10^{-3}M - 10^{-2}M NEM. Hier überwiegt im Gegensatz zu Röntgenstrahlen anfangs die Na^+-Aufnahme gegenüber dem K^+-Verlust. Im zeitlichen Verhalten findet sich ein weiterer Unterschied: K^+-Verlust und Na^+-Aufnahme verlaufen fast gleichmäßig über den gesamten Zeitraum von 2o h. Es findet also in den ersten Stunden der Suspension keine stärkere Verschiebung statt, wie dies nach Bestrahlung der Fall ist.

NBS fällt aus diesen Analogiebetrachtungen stark heraus. Zwar führt 10^{-3}M NBS zu einem K^+-Verlust, der etwa der Wirkung von 5 krad Röntgenstrahlen gleichzusetzen ist; dabei findet jedoch nur eine sehr geringe Zunahme des Na^+-Gehaltes statt. Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der K^+-Abnahme, so findet man die stärksten Verschiebungen wie nach Röntgenbestrahlung in den ersten Stunden.

pCMB reagiert fast ausschließlich mit SH-Gruppen, NEM mit SH-Gruppen und NH_2-Gruppen, und NBS mit aciden homöopolar gebundenen H-Atomen der aromatischen Aminosäuren. Ein Vergleich der durch membranwirksame Agentien hervorgerufenen Elektrolytverschiebungen mit den von Röntgenstrahlen induzierten Elektrolytverschiebungen zeigt, daß die membrangebundenen SH-Gruppen nicht nur einen von mehreren gleichbedeutenden Angriffspunkten der Strahlen darstellen, sondern das empfindlichste Substrat überhaupt sind. Von nachgeordneter Bedeutung sind offenbar erst Veränderungen von NH_2-Gruppen (NEM-Wirkung). Die H $\rightleftarrows$ Br Substitution mit nachfolgender oxidativer Spaltung der aromatischen Aminosäuren (NBS-Wirkung) führt vornehmlich zu K^+-Verlusten, ist also ihrem Mechanismus nach sicherlich anders zu beurteilen, als die Wirkung der Röntgenstrahlen.

NEM reagiert wie pCMB mit SH-Gruppen und führt zu einer Alkylierung. Die Versuchsergebnisse zeigen, daß diese Veränderung erst bei höheren NEM Konzentrationen zu Elektrolytverschiebungen führt. Möglicherweise liegt dies aber auch daran, daß das frei permeable

NEM-Molekül zum großen Teil mit intracellulären SH-Gruppen reagiert. Bei der Suspension von Erythrozyten mit NEM halten die Elektrolytverschiebungen fast gleichmäßig über die gesamte Suspensionszeit an. Aus diesem Verhalten darf geschlossen werden, daß NEM nicht nur mit SH-Gruppen (kurze Reaktionszeit, BREWER u. RIEHM 1967), sondern auch mit NH_2-Gruppen reagiert. Daraus folgt, daß sich diese Art von Veränderung zwar ebenfalls in Elektrolytverschiebungen, aber mit einer anderen Kinetik äußert.

Die NBS-Wirkung kann als eine Membranveränderung umschrieben werden, die zwar den K^+-Efflux erlaubt, aber einen weiteren Influx von Na^+-Ionen verhindert. Das Verhalten der Na^+-Ionen, die nur in geringem Umfange aufgenommen werden, bleibt dabei unklar. Bei der Reaktion von NBS mit Proteinen werden vor allem die aromatischen Aminosäuren verändert. Dieser Befund könnte auf eine besondere Rolle der aromatischen Aminosäuren bei der Permeabilitätsfunktion der Membran hinweisen. Die Strahlenempfindlichkeit der einzelnen Aminosäuren nimmt in der Reihe Cys > Met > Phe > His > Thr > Tyr ... ab (SHIMAZU, TAPPEL 1964).

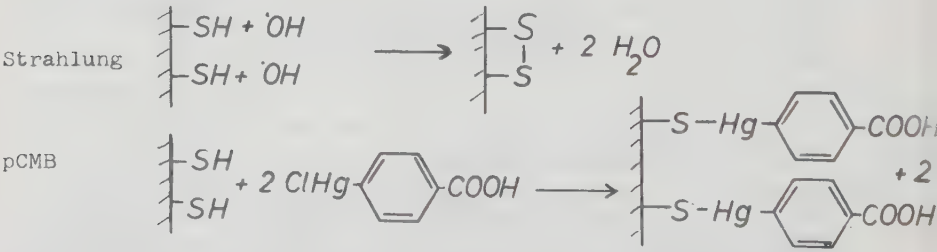
4.3 Die Addition der Noxen

Wirken zwei Noxen ausschließlich auf das gleiche Substrat, so addieren sich ihre Wirkungen voll bis zu einem bestimmten Punkt, dann nur noch teilweise bis zum Erreichen eines Grenzwertes. Entweder haben dann alle reaktionsfähigen Gruppen (z.B. SH-Gruppen) reagiert, oder der zu beobachtende Effekt hat sein Maximum erreicht. Bewirkt aber die Noxe B nach Einwirkung der Noxe A einen stärkeren Effekt als bei jeweils isolierter Anwendung nur einer Noxe, so wird von einer Sensibilisierung gesprochen.

Im Gegensatz zu unbestrahlten Erythrozyten zeigen die bestrahlten Proben schon bei einer pCMB-Konzentration von 10^{-5}M nennenswerte Veränderungen ihres Elektrolytgehaltes. Ebenso sind die zusätzlichen pCMB-bedingten Elektrolytverschiebungen bei einer

Konzentration von 10^{-4}M stärker ausgeprägt, als einer reinen Addition der Wirkung beider Noxen entsprechen würde. Die vorhergehende Bestrahlung hat also zu einer Sensibilisierung der Erythrozyten gegenüber pCMB geführt. Eine mit steigender Dosis zunehmende Sensibilisierung läßt sich innerhalb der ersten 5 Stunden der Suspensionszeit feststellen, in denen auch die pCMB Wirkung am größten ist. Nach 2o Stunden Suspension sind die pCMB-bedingten zusätzlichen Elektrolytverschiebungen bei 5 krad am stärksten ausgeprägt. Bei höheren Strahlendosen (20 h) nehmen diese zusätzlichen Verschiebungen jedoch wieder ab; der K^+-Na^+-Gehalt der Erythrozyten ist dann rein strahlenbedingt schon so verändert, daß nur noch ein Grenzwert erreicht werden kann.

Da beide Noxen pCMB und Röntgenstrahlen das gleiche Substrat: "SH-Gruppen" angreifen, hätte man eine Addition der Wirkungen und keine Sensibilisierung erwartet. Eine mögliche Erklärung für die vorliegende Sensibilisierung könnte der folgende Reaktionsmechanismus bieten:



Während die Strahlenwirkung über OH-Radikale zur Bildung von Disulfiden führt, die ihrerseits auch wieder gespalten werden können (Reaktion mit H-Radikalen), bewirkt pCMB eine irreversible Bindung mit den SH-Gruppen. Es ist denkbar, daß die Oxidation einiger SH-Gruppen (zu Disulfiden oder zu S-Hg-Bindungen) bei Einwirkung jeweils einer Noxe zu Elektrolytverschiebungen führt. Bei Einwirkung beider Noxen kann der Effekt der Einzelnoxen potenziert werden, wenn strahlenbedingt native Disulfidbrücken durch H-Radikale in SH-Gruppen überführt werden und danach durch pCMB irreversibel oxidiert werden, während sich bei alleiniger Bestrahlung lediglich ein Gleichgewicht zwischen SH und SS-Bindungen einstellt.

NEM zeigt erst bei der hohen Konzentration von 10^{-2}M einen Effekt auf den Elektrolytgehalt von Erythrozyten, der dann aber auch sehr stark ist. Bei der Kombination mit Röntgenstrahlen kommt es nur im Bereich kleiner Dosen (5 krad) zu einer Addition der Effekte. Die Elektrolytverschiebungen zu unterschiedlichen Zeiten lassen sich mit der reinen Strahlenwirkung schlecht vergleichen, da ein unterschiedlicher Verlauf vorliegt. Gerade dieser Unterschied und die gegenüber dem K^+-Verlust höhere Na^+-Aufnahme nach 3 und 5 h weisen darauf hin, daß NEM nicht nur mit SH-Gruppen, sondern offenbar auch mit NH_2-Gruppen reagiert. Die dadurch ausgelösten Verschiebungen unterscheiden sich von den strahlenbedingten Elektrolytverschiebungen. Das heißt, eine eventuell strahlenbedingte Veränderung von NH_2-Gruppen trägt wohl kaum zu den Elektrolytverschiebungen nach Röntgenbestrahlung bei.

NBS (10^{-3}M) zeigt nach Bestrahlung mit 5 krad bezüglich des K^+-Verlustes wiederum eine sensibilisierende Wirkung. Erst bei 20 krad nimmt die zusätzliche NBS-Wirkung ab; hier ist nur noch eine Addition der Effekte festzustellen. Offenbar werden durch die Strahleneinwirkung Umlagerungen in der Zellmembran hervorgerufen, die den NBS-Angriff erleichtern. Die Vermutung, daß durch NBS die Zelle völlig zerstört wird, konnte durch die Bestimmung des freigesetzten Hämoglobins im Überstand geprüft werden. Danach werden bei einer Konzentration von 2 x 10^{-3}M NBS etwa 40 bis 50 % der Erythrozyten während einer Suspension von 20 h durch Hämolyse zerstört.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die strahlenbedingten Elektrolytverschiebungen menschlicher Erythrozyten untersucht und mit den Elektrolytverschiebungen verglichen, die durch drei verschiedene membranwirksame Agentien mit bekannter chemischer Wirkung hervorgerufen wurden. Zusätzlich wurde die kombinierte Wirkung beider Noxen (Strahlung + chemisches Agenz) untersucht. Die Arbeit sollte zeigen, welche membraneigenen Gruppen durch die Bestrahlung verändert werden und ursächlich Anlaß zu den Elektrolytverschiebungen geben.

Parachloromercuribenzoat (pCMB) reagiert vorwiegend mit SH-Gruppen der Zellmembran. Im Bereich von 10^{-4} bis 10^{-3}M entspricht seine Wirkung den Elektrolytveränderungen nach einer Bestrahlung mit 0 - 20 krad. Die sensibilisierende Wirkung, die nach Bestrahlung und pCMB-Einwirkung beobachtet wird, wird darauf zurückgeführt, daß pCMB die SH-Gruppen irreversibel bindet, während eine Bestrahlung zur Bildung von Disulfidbrücken führt, die ihrerseits wieder gespalten werden können.

N-Äthylmaleinimid (NEM) greift SH- und NH_2-Gruppen an. Seine Wirkung auf den Elektrolytgehalt macht sich erst in hohen Konzentrationen ab 10^{-3}M bemerkbar. Im Gegensatz zu pCMB dringt aber NEM auch in die Zelle ein und reagiert deshalb auch mit intrazellulären SH-Gruppen. Damit erklären sich die höheren Konzentrationen, die zur Erzielung von Elektrolytverschiebungen erforderlich sind. Dieser Befund zeigt aber auch, daß die Veränderung von intrazellulären SH-Gruppen weit weniger am Zustandekommen der Elektrolytverschiebungen beteiligt sind. Nach längerer Einwirkungszeit werden auch die NH_2-Gruppen verändert; ihr Beitrag zu den Elektrolytverschiebungen (zusätzliche Wirkung nach längerer Inkubationszeit) ist jedoch gering.

N-Bromsuccinimid (NBS) spaltet aromatische Aminosäuren. Diese Reaktion beansprucht besonderes Interesse, da nach den SH-tragenden Aminosäuren die aromatischen Aminosäuren die höchste

Strahlenempfindlichkeit aufweisen. NBS führt zwar zu K^+-Verschiebungen, aber kaum zu Na^+-Veränderungen. Dieses Ergebnis läßt den Schluß zu, daß die Veränderung aromatischer Aminosäuren zwar den K^+-Efflux erhöht, eine entsprechende Na^+-Aufnahme aber verhindert. Ein derartiges Befundbild, das von dem strahlenbedingter Elektrolytverschiebungen stark abweicht, weist darauf hin, daß eine Veränderung aromatischer Aminosäuren nur teilweise zu dem Effekt "strahlenbedingte Elektrolytverschiebungen" beiträgt, und eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse eindeutig, daß die Veränderung membrangebundener SH-Gruppen nicht nur einen der vielen möglichen Angriffspunkte ionisierender Strahlen darstellt, sondern daß die SH-Gruppen als Hauptangriffspunkt oder empfindlichste Struktur anzusehen sind. Die Veränderung intrazellulärer SH-Gruppen, die Alkylierung von Aminogruppen und die oxydative Spaltung aromatischer Aminosäuren mögen zwar zu dem beobachtbaren Schadenskriterium (Elektrolytverschiebungen) beitragen, spielen aber nur eine untergeordnete Rolle.

LITERATURVERZEICHNIS

1 BIDE,R.W., MYERS,D.K.: Effect of Thiol-Masking Agents on the Stromata of Rat Erythrocytes.
Can.J.Biochem. 45, 19 - 29 (1967)

2 BIRCHMEYER,W., CHRISTEN,Ph.: Chemical Evidence for Syncatalytic Conformational Changes in Aspartate Aminotransferase.
FEBS-Letters 18, 209 - 213 (1971)

3 BRESCIANI,F., AURICCHIO,F., FIORE,C.: Effect of X-rays on Movements of Sodium in Human Erythrocytes.
Radiat.Res. 21, 394 - 412 (1964)

4 BREWER,C.F., RIEHM,J.P.: Evidence for Possible Nonspecific Reactions between N-Ethylmaleimid and Proteins.
Anal.Biochem. 18, 248 - 255 (1967)

5 CECIL,R., McPHEE,J.R.: The Sulfur Chemistry of Proteins.
Advanc. Protein Chem. 14, 255 (1959)

6 CHAPMAN,I.V., STURROCK,M.G.: The Effects of X-Irradiation in Vitro on the Transport of Potassium Ions in Thymocytes.
Int.J.Radiat.Biol. 22, 1 - 9 (1972)

7 CIVIDALLI,G.: Inhibition of Stromal Enzymes by X-Radiation.
Radiat.Res. 20, 564 - 576 (1963)

8 DEME,D., DUNICA-TRAUTMANN,O., CHATAGNER,F.: The Thiol Group of Rat Liver Cystathionase.
Eur.J.Biochem. 20, 269 - 275 (1971)

9 ELDJARN,L., PIHL,A.: Mechanisms of Protective and Sensitizing Action. In: Mechanisms in Radiobiology Vol.2, 231 (1961) Eds: M. Errera, A. Forssberg
Academic Press, New York (1961)

10 FREISHEIM,H., HUENNEKENS,F.M.: Effect of N-Bromsuccinimid on Dihydrofolate Reductase.
Biochemistry 6, 2271 - 2276 (1969)

11 GODIN,D.V., SCHRIER,St.L.: Modification of the Erythrocyte Membrane by Sulfhydryl Group Reagents.

12 HERRMANN,R.: Flammenphotometrie
Springer-Verlag,Berlin, Göttingen, Heidelberg 1956

13 JAKOB,H.S., JANDL,H.J.: Effects of Sulfhydryl Inhibition on Red Blood Cells. I.Mechanism of Hemolysis.
J.Clin.Invest. 41, No.4, 779 - 792 (1962)

14 KANKURA,T., NAMAKURA,W.,ETO,H., NAKAO,M.: Effect of Ionizing Radiation on Passive Transport of Sodium Ion into Human Erythrocytes.
Int.J.Radiat.Biol. 15, No.2, 125 - 136 (1968)

15 KOLLMANN,G., SHAPIRO,B., MARTIN,D.: The Mechanism of Radiation Hemolysis in Human Erythrocytes.
Radiat.Res. 37, 551 - 566 (1969)

16 LEHMAN,F., WELS,P.: Die Wirkung der Röntgenstrahlen auf die Durchlässigkeit der roten Blutkörperchen für Elektrolyte.
Pflügers Archiv 213, 628 - 641 (1926)

17 LEHNARTZ,E.: Chemische Physiologie. S. 127
Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1959

18 MATTENHEIMER,H.: Mikromethoden für das klinisch-chemische und biochemische Laboratorium.
2. Auflage, S. 9o - 91, Verlag Walter de Gruyter & Co, Berlin 1966

19 MORCZEK,A.: Untersuchungen über den Kalium-Natrium-Austausch von Erythrozyten durch die Einwirkung ionisierender Strahlen.
Strahlentherapie 96, 618 - 624 (1955)

20 MORCZEK,A., ABRAHAM,K.: Zum Mechanismus der Strahlenwirkung auf den K^+-Na^+- Austausch in Erythrozyten.
Biophysik 4, 113 - 117 (1967)

21 MYERS,D.K.: Some Aspects of Radiation Effects on Cell Membranes.
Adv.Biol.Med.Phys. 13, 219 - 234 (1970)

22 MYERS,D.K., BIDE,R.W.: Biochemical Effects of X-Irradiation on Erythrocytes.
Radiat.Res. 27, 25o - 263 (1966)

23 MYERS,D.K., CHURCH,M.L.: Inhibition of Stromal Enzymes by X-Radiation.
Nature 219, 636 - 637 (1967)

24 MYERS,D.K., LEVY,L.: Adenosine-Triphosphatase and Potassium Retention in X-Irradiated Erythrocytes.
Nature 204, 1324 - 1326 (1964)

25 MYERS,D.K., SLADE,D.E.: Radiosensitization of Mammalian Cells by Iodoacetamide and Related Compounds.
Radiat.Res. 30, 186 - 2o3 (1967)

26 NAKKEN,K.F.: Radiation Damage to Erythrocyte Membranes and its Modification.
Strahlentherapie 129, 586 - 595 (1966)

27 RATHGEN,G.H., LIESER,H.: Zur Bedeutung des Glutathions bei der Strahlenwirkung und beim chemischen Strahlenschutz.
Strahlentherapie 143, 67o - 676 (1972)

28 RINK,H.: Folgen und Ursachen strahlenbedingter Elektrolytverschiebungen.
Habil.Med.Fak. Bonn 1974

29 SHAPIRO,B.,KOLLMANN,G.: The Nature of Membrane Injury in Irradiated Human Erythrocytes.
Radiat.Res. 34, 335 - 346 (1968)

30 SHAPIRO,B., KOLLMANN,G., ASNEN,J.: Mechanism of the Effect of Ionizing Radiation on Sodium Uptake by Human Erythrocytes.
Radiat.Res. 27, 139 - 158 (1966)

31 SHEPPARD,C.W., STEWART,M.J.: The Direct Effect of Radiation on Erythrocytes.
J.Cell.Comp.Physiol. 39, Suppl.2, 189 - 215 (1952)

32 SHIMAZU,F.. TAPPEL,A.L.: Comparative Radiolability of Amino Acids of Proteins and Free Amino Acids.
Radiat.Res. 23, 2o3 - 2o9 (1964)

33 SMYTH,D.G., NAGAMATSU,A., FRUTON,J.S.: Some Reactions of N-ethylmaleimide.
J.Amer.Chem.Soc. 82, 4600 (1960)

34 SPANDE,T.F., GREEN,N.M., WITKOP,B.: The Reaktivity toward N-Bromsuccinimide of Tryptophan in Enzymes, Zymogens and Inhibited Enzymes.
Biochemistry 5, 1926 - 1933 (1966)

35 SUTHERLAND,R.M., PIHL,A.: Repair of Radiation Damage to Erythrocyte Membranes: The Reduction of Radiation-Induced Disulfide Groups.
Radiat.Res. 34, 300 - 314 (1968)

36 SUTHERLAND,R.M., ROTHSTEIN,A., WEED,R.I.: Erythrocyte Membrane Sulfhydryl Groups and Cation Permeability.
J.Cell.Physiol. 69, 185 - 198 (1967)

37 SUTHERLAND,R.M., STANNARD,J.N., WEED,R.I.: Involvement of Sulfhydryl Groups in Radiation Damage to the Human Erythrocyte Membrane.
Int.J.Radiat.Biol. 12, 551 - 564 (1967)

38 WITKOP,B.: Chemical Cleavage of Proteins.
Science 162, 318 - 326 (1968)

39 TING,T.P., ZIRKLE,P.: The Kinetics of the Diffusion of Salts Into and Out of X-Irradiated Erythrocytes.
J.Cell.Comp.Physiol. 16, 197 - 206 (1940)

LEBENSLAUF

Geburtsdatum	3.Juli 1951	
Geburtsort	Lutzerath, Krs. Cochem/Mosel	
Eltern	Elektromeister Anton Theobald und Ehefrau Rosa geb. Schenk	
Schulen	April 1958 bis März 1965	Kath. Volksschule Lutzerath
	April 1965 bis Juni 1970	Staatl. Aufbaugymnasium Wittlich/Eifel
	Juni 1970	Abitur
Studium	Medizinstudium an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn WS 1970/71 bis SS 1976	
	Juli 1971	Vorphysikum
	März 1973	Physikum
	Juli 1976	Medizinisches Staatsexamen
Berufliche Ausbildung	Medizinalassistentin seit 1.Oktober 1976 in der Gynäkologisch-Geburtshilflichen Abteilung des Malteser Krankenhauses in Bonn	